

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie
Molekular Diagnostik
des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. H. Renz



**Untersuchungen zum Einsatz nanopartikulärer
Trägersysteme zur Transfektion von Immun- und
Alveolarzellen mit therapeutischen DNAsen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von

Christoph Paul

aus Gießen

Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 24.05.2012

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. M. Rothmund
Referent:	PD Dr. H. Garn
Korreferent:	Prof. Dr. F. Czubayko

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Asthma bronchiale.....	5
1.2	Die Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale	6
1.3	Antisense-Strategien.....	10
1.3.1	Antisense-Oligonukleotide	11
1.3.2	RNA-Interferenz.....	12
1.3.3	Ribozyme.....	12
1.3.4	DNAzyme.....	13
1.4	Die Aufnahme von therapeutischen Oligonukleotiden	15
1.5	Surfactant.....	16
1.6	Vektorsysteme	17
1.7	Hypothesen und Zielsetzung der Arbeit	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Polyplexe und Lipoplexe	22
2.1.1	Berechnung des N/P Verhältnisses.....	23
2.1.2	Messung der Partikelgröße und des Zeta-Potentials	23
2.2	Zellkultur	24
2.2.1	Zelllinien.....	24
2.2.2	Kultivierung der Zellen	25
2.2.3	Zellzählung	26
2.3	Durchflusszytometrische-Analysen.....	27
2.4	Konfokale Mikroskopie.....	31
2.5	Tierexperimientelle Analysen.....	33
2.5.1	Sensibilisierung und lokale Allergenprovokation	33
2.5.2	Therapie.....	34
2.5.3	Messung der Lungenfunktion.....	35
2.5.4	Präparation und Probengewinn.....	37
2.5.5	Bronchoalveolären Lavage (BAL)	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Surfactant als Transfektionsmittel <i>in vitro</i>	40
3.1.1	Alveofact® führt nicht zu einer verbesserten Aufnahme.....	40
3.1.2	Curosurf® führt nicht zu einer verbesserten Aufnahme	42

3.1.3	Die Versuchsergebnisse sind unabhängig vom verwendeten DNAzym	44
3.2	PEI und PEI-PEG Polyplexe <i>in vitro</i>	45
3.2.1	PEI und PEI-PEG Polymere sind zur Transfektion geeignet	45
3.2.2	Die Transfektionseffizienz ist konzentrationsabhängig	46
3.2.3	PEG-Seitenketten beeinflussen die Transfektionseffizienz.....	47
3.2.4	Die Transfektionseffizienz ist abhängig vom N/P Verhältnis	48
3.2.5	PEI-PEG Polyplexe werden in die Zelle aufgenommen	50
3.2.6	Lokalisation von Polyplexen in lysosomalen Strukturen	52
3.2.7	Die Polymere bilden kondensierte Komplexe	53
3.3	PEI-PEG Polyplexe <i>in vivo</i>	54
3.3.1	Atemwegswiderstand	55
3.3.2	Veränderungen der Bronchoalveolären Lavage	56
4	Diskussion.....	59
4.1	Surfactant und die Aufnahme von DNAzymen.....	59
4.2	PEI-PEG Polymere als Vektorsystem <i>in vitro</i>	62
4.2.1	Über den Einfluss von PEG-Seitenketten.....	64
4.2.2	Über den Einfluss unterschiedlicher N/P-Verhältnisse	65
4.2.3	Über die Aufnahme von PEI-Polyplexen	66
4.2.4	Schlussfolgerungen zur <i>in vitro</i> Transfektion von DNAzymen mit PEI und PEI-PEG	67
4.3	PEI-PEG Polymere als Vektorsystem <i>in vivo</i>	67
4.4	Schlussfolgerungen.....	70
5	Zusammenfassung	71
6	Summary	73
7	Abkürzungsverzeichnis.....	75
8	Abbildungsverzeichnis	78
9	Quellenverzeichnis.....	80
10	Verzeichnis akademische Lehrer	93
11	Danksagung.....	94

1 Einleitung

„Asthma ist eine Volkskrankheit mit einer immensen sozialen Auswirkung und steigender Prävalenz in vielen Teilen der Welt.“ (Dietel, 2008)

1.1 Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine chronische, entzündliche Atemwegserkrankung, die besonders die mittleren und großen Atemwege betrifft. Kennzeichnend für die Erkrankung sind die „Asthmaanfälle“: variablen, intermittierend auftretenden Atemwegsobstruktionen, die ganz oder überwiegend reversibel sind. Während eines Asthmaanfalls führt die Verengung der Atemwege zu einer erschwerten Ausatmung – die Lunge wird überbläht und der Gasaustausch eingeschränkt, was im schlimmsten Fall zum Tod führen kann.

Man unterscheidet zwei wesentliche Varianten des Asthma bronchiales:

- Das extrinsische (oder allergische) Asthma, bei dem als Auslöser inhalierte Antigene angesehen werden und bei dem es sich pathogenetisch um eine Allergie handelt.
- Das intrinsische (oder endogene) Asthma, bei dem ein allergischer Mechanismus nicht nachweisbar ist. Der Pathomechanismus hierbei ist weniger gut erforscht. Eine Auslösung durch infektiöse Agenzien wie z.B. virale Atemwegsinfekte wird diskutiert (Classen et al., 2004).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der deutlich häufigeren Form des extrinsischen Asthmas.

Asthma Bronchiale ist eine der häufigsten chronischen Krankheiten mit weltweit ca. 300 Millionen Erkrankten (Masoli et al., 2004). Besonders betroffen sind Kinder. In Deutschland ist etwa jedes zehnte Kind und jeder zwanzigste Erwachsene Asthmatiker (RKI, 2006). Weiterhin ist Asthma ein zunehmendes Problem. In der aktuell durchgeführten ISAAC Studie (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) zeigte sich, dass die Prävalenz von Asthma bronchiale international

betrachtet stark ansteigt (Pearce et al., 2007). Während die Zahl der Erkrankten in Westeuropa und den USA möglicherweise ein Plateau erreicht hat, gibt es besonders in den Schwellenländern einen starken Zuwachs (Asher et al., 2006). Neben der Belastung der Betroffenen stellt Asthma auch ein volkswirtschaftliches Problem dar. Jährlich entstehen direkte Kosten von etwa 2,4 Milliarden Euro (Renz et al., 2008). Aufgrund der Häufigkeit des Asthmas, der Schwere und Dauer der Erkrankung sowie der entstehenden Kosten, ist die Therapie und die Suche nach neuen Therapeutika von hohem Interesse.

Asthmatiker werden je nach Stärke ihrer Erkrankung therapiert (Karow, 2010). Die Therapieziele sind die Minderung der Atemwegsobstruktion und die Unterdrückung des Entzündungsprozesses. Häufig wird eine Kombination aus Dauermedikation (*Controller*) und Bedarfsmedikation (*Reliever*) gewählt. Zumeist werden beim persistierenden Asthma antiinflammatorische Kortikosteroide und bronchodilative β_2 -Sympathomimetika eingesetzt. Diese können ergänzt werden durch retardiertes Theophyllin, Montelukast und systemische Glukokortikoide (Buhl et al., 2006). Neuere und spezifischere Ansätze der Therapie sind IgE bindende Antikörper wie Omalizumab, Interleukin-4 bindende Rezeptoranaloga, die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und die spezifische Immuntherapie. Trotz aller Forschungsanstrengungen existiert zur Zeit noch keine effektive kausale Therapie, so dass weiterhin Bedarf nach effektiven, spezifischen und nebenwirkungsarmen Therapeutika besteht.

1.2 Die Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale

Grundlage des allergischen Asthma bronchiale ist die angeborene oder erworbene Veranlagung des bronchialen Atemwegssystems auf bestimmte inhalative Noxen mit einer quantitativ und qualitativ inadäquaten Entzündung zu reagieren (Classen et al., 2004). Man geht dabei von einer multifaktoriellen Genese aus, da sowohl korrelierende Umweltreize als auch korrelierende genetische Faktoren identifiziert werden konnten. Genetisch zeigt Asthma bronchiale eine Korrelation mit einer Prädisposition, die als Atopie bezeichnet wird. Dabei handelt es sich um die Veranlagung, auf Allergene mit der Produktion von IgE-Antikörpern zu reagieren (Holgate, 1997). In der Metaanalyse von genetischen Assoziationsstudien konnten jeweils in 10 oder mehr Studien eine

Korrelation von atopischen Patienten mit Veränderungen der Gene für Interleukin-4 (IL-4), dem IL-4 Rezeptor und IL-13 gezeigt werden (Contopoulos-Ioannidis et al., 2007). Umweltreize können beim Asthma bronchiale sowohl protektive als auch schädliche Einflüsse haben. So geht man davon aus, dass eine intrauterine oder kindliche mikrobielle Stimulation des Immunsystems, wie in der Hygiene-Hypothese beschrieben, einen protektiven Einfluss auf atopische Erkrankungen wie das allergische Asthma bronchiale hat (Strachan, 2000). Luftverschmutzung u.a. durch Stickstoff, Dioxid, Ozon und Staub scheint hingegen ein wichtiger Faktor für die Entstehung des Asthmas bronchiale zu sein, wobei diese sowohl durch fossile Brennstoffe als auch Zigaretten entsteht (D'Amato, 2000; Mantzouranis, 2008). Virale Infektionen können sowohl protektive als auch Asthma induzierende Einflüsse darstellen (Lemanske, 2004).

Hinsichtlich der pathophysiologischen Mechanismen des allergischen Asthma bronchiales lassen sich zwei Phasen unterscheiden: Eine Sensibilisierungsphase, in der die immunologische Grundlage für die Entzündungsreaktion gelegt wird, und eine Entzündungsphase, in der die Pathomechanismen zum Tragen kommen. Die Entzündungsphase kann noch einmal in eine Sofortreaktion und eine chronische Reaktion unterschieden werden (Valenta, 2002) (siehe Abbildung 1).

In der Sensibilisierungsphase werden inhalierte Allergene über die Mukosa aufgenommen und von gewebständigen Antigen-Präsentierenden Zellen (APC), wie zum Beispiel von Dendritischen Zellen (DC) und Makrophagen, phagozytiert. Dort werden die Allergene prozessiert und über MHC-II Moleküle präsentiert (Racioppi et al., 1993). Nach ihrer Aktivierung migrieren die APCs in die drainierenden Lymphknoten (Lambrecht et al., 2001), wo das an ihren MHC-II präsentierte Antigen von naiven CD4 positiven T-Helferzellen (T_H0 -Zellen) über den Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor (T-Cell receptor, TCR) erkannt wird (Davis et al., 1998). Nach positiver Interaktion von MHC-II und TCR differenziert sich die T_H0 -Zelle. Zu welcher Form sie sich differenziert ist dabei abhängig von Antigen, dessen Konzentration und dem vorherrschendem Zytokinmilieu:

- Bei hohen Antigen-Dosen und unter dem Einfluss der Zytokine Interleukin-12 (IL-12) und IL-18 erfolgt eine Differenzierung zu T_H1 -Zellen (Hsieh et al., 1993).

- Bei niedrigen Antigen-Dosen und unter dem Einfluss von IL-4 erfolgt eine Differenzierung zu T_H2 -Zellen (Schmitt et al., 1990).

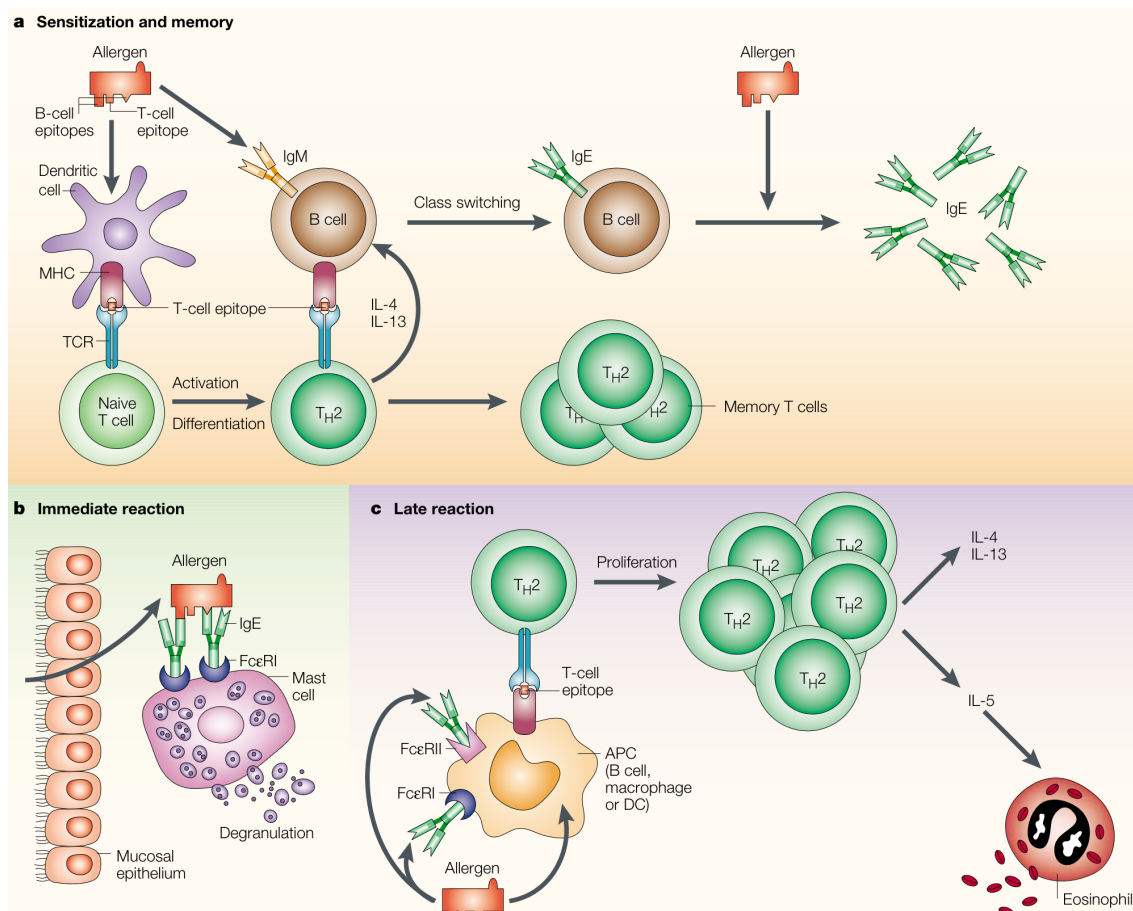


Abbildung 1: Molekulare Mechanismen des Asthma bronchiale (Valenta, 2002)

a) Schematische Darstellung der Sensibilisierung: Der Kontakt von löslichem Antigen mit der Mukosa der Atemwege kann zur Aufnahme dieses Antigens durch APCs oder Antigen spezifischen B-Zellen führen. Falls dabei eine T_H2 -Antwort induziert wird, werden Zytokine wie IL-4 und IL-13 produziert, die einen Immunglobulin-Klassen Wechsel zu IgE unterstützen (Sensibilisierung). Die Sensibilisierung führt zur Ausbildung von IgE-B-Gedächtniszellen und allergen-spezifischen T-Gedächtniszellen. Wiederholter Allergenkontakt steigert die Anzahl an B- und T-Gedächtniszellen und erhöht die Menge der produzierten IgE Antikörper, die an Mastzellen, B-Zellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen über den FcεRI und FcεRII-Rezeptor gebunden werden. b) Sofortreaktion: Durch Kreuzvernetzung spezifischer gebundener IgE-Antikörper an der Zellmembran wird bei Mastzellen die Degranulation von Histamin und Leukotrien ausgelöst. c) Spätreaktion: Die Spätreaktion wird bedingt durch die Präsentation des allergischen Antigens an T-Zellen die dadurch aktiviert werden, proliferieren und pro-inflammatorische Zytokine wie zum Beispiel IL-4, IL-5 und IL-13 sezernieren. IL-5 führt dabei zu einer verstärkten Freisetzung von Eosinophilen Granulozyten aus dem Knochenmark, zu einer verlängerten Lebensdauer der Eosinophilen Granulozyten, zur Chemoattraktion der Eosinophilen Granulozyten in das Entzündungsgebiet und zu ihrer Aktivierung.

Die proliferierenden T_H2 -Zellen führen bei B-Zellen zu einem Immunglobulin (Ig) Isotypenwechsel hin zu IgE. Dieser Mechanismus wird durch die von den T_H2 -Zellen sezernierten Zytokine IL-4 und IL-13 sowie durch die Interaktion mehrerer Oberflächenmoleküle auf B- und T-Zellen (IgM/AG/TCR, CD80/CD28, CD40/CD40

Ligand) induziert (Bacharier et al., 1998). Die produzierten IgE Antikörper können über den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεR1 auf Mastzellen und basophilen Granulozyten und über den niedrig affinen IgE Rezeptor FcεR2 (CD23) auf eosinophilen Granulozyten gebunden werden (Gould and Sutton, 2008).

Bei wiederholtem Allergenkontakt kommt es zur Entzündungsreaktion. An der Oberfläche der Mastzelle führt das Allergen bei spezifischer Bindung an FcεRI-gebundene IgE-Moleküle zur Kreuzvernetzung des FcεRI (Holgate, 1997). Hierdurch wird die Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren wie Histamin und verschiedener Prostaglandine und Leukotriene eingeleitet (Miescher and Vogel, 2002). Die Mediatoren induzieren die Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege, steigern die Mukusproduktion und verursachen eine Vasodilatation der angrenzenden Gefäße, wodurch es im Zusammenspiel zur Verengung der Atemwege kommt (Persson et al., 1995). Die Spätreaktion der Entzündung, die Stunden bis Tage nach dem Allergenkontakt eintritt, ist dominiert durch T_H2-Zellen und von ihnen aktivierte eosinophile Granulozyten. Durch Antigenpräsentation von APCs in regionalen Lymphknoten werden in zunehmender Zahl T_H2-Zellen rekrutiert (Holt and Upham, 2004). Diese wiederum IL-5 vermittelt eine Migration von eosinophilen Granulozyten ins Lungengewebe ein und aktivieren diese. Hierdurch entsteht eine IL-5 abhängige, von den Eosinophilen Granulozyten geprägte Entzündungsreaktion in der Lunge (Cieslewicz et al., 1999).

Als chronische Reaktion des Gewebes auf die Entzündungsreaktion kommt es zum Gewebsumbau, der als „airway remodelling“ bezeichnet wird (Homer and Elias, 2000). Im Asthma bronchiale ist dieser gekennzeichnet durch Verdickung des Epithels (Beasley et al., 1989), Hyperplasie der Becherzellen (Ordonez et al., 2001), Verdickung der retikulären Basalzellmembran (Beasley et al., 1989), Kollagen Fibrose (Roche et al., 1989), Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Atemwegsmuskulatur (Ebina et al., 1993) und eine vermehrte Vaskularisierung (Berend et al., 2008; Carroll et al., 1997). Vermutlich durch einen multifaktoriellen Mechanismus, unter anderem durch das *airway remodelling*, die Veränderung der glatten Atemwegsmuskulatur die Entzündungsreaktion und neuronale Steuerungsmechanismen, kommt es zu der, für das Asthma bronchiale kennzeichnenden Atemwegsüberempfindlichkeit (AHR) (Berend et al., 2008). Diese ist als erhöhte bronchioobstruktive Reaktion auf das Allergen oder

einen unspezifischen Stimulus (wie zum Beispiel durch Metacholin) definiert (Bergeron and Boulet, 2006).

Eine zentrale Rolle im hier beschriebenen Pathomechanismus spielt der Transkriptionsfaktor GATA-3. Er ist essentiell für die Differenzierung von naiven T_H0 -Zellen zu T_H2 -Zellen (Murphy and Reiner, 2002) und spielt eine wichtige Rolle in der Synthese der T_H2 typischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 (Zhu et al., 2006). Bereits eine basale Expression von GATA-3 in T-Zellen kann eine T_H1 -Differenzierung verhindern (Zhu et al., 2004). Im Asthma bronchiale spielt GATA-3 eine entscheidende Rolle. So kann in CD4-positiven T-Helfer-Zellen im Asthmodell eine erhöhte Expression von GATA-3 nachgewiesen werden (Nakamura et al., 1999), während der T_H1 -Transkriptionsfaktor T-bet vermindert ist (Finotto et al., 2002). Dies spricht für eine T_H2 dominierte Genese beim Asthma bronchiale, für die es auch im Mausmodell gute Hinweise gibt (Wills-Karp, 1999). GATA-3 wird jedoch nicht ausschließlich in T_H2 -Zellen exprimiert. So konnte er in verschiedenen Epithelzellen, Adipozyten und Nervenzellen bei Mensch und Maus nachgewiesen werden (Ho and Pai, 2007). Aufgrund seiner entscheidenden Funktion in der T_H2 -Zelle und in der Produktion von T_H2 typischen Zytokinen, bietet sich GATA-3 als therapeutischer Angriffspunkt für die T_H2 dominierte Erkrankung Asthma bronchiale an (Finotto et al., 2001).

1.3 Antisense-Strategien

Eine Möglichkeit, um einen Transkriptionsfaktor wie GATA-3 oder ein anderes Protein funktionell zu supprimieren, besteht in der Hemmung seiner Proteinbiosynthese. Dies kann technisch durch verschiedene Verfahren erreicht werden, die als „Antisense“-Strategien bezeichnet werden. Diesen Verfahren gemeinsam ist, dass die Proteinkodierende-„Sense“-mRNA über ein komplementäres „Antisense“-Molekül blockiert oder abgebaut wird, und somit ihre Translation verhindert wird.

Vier technische Varianten sind dabei hervorzuheben (siehe Abbildung 2):

- Antisense-Oligonukleotide (siehe Abschnitt 1.3.1), welche kleine DNA Fragmente sind, die mit der Ziel-mRNA hybridisieren und hierdurch die Translation blockieren.

- siRNAs (siehe Abschnitt 1.3.2), welche kleine RNA Moleküle sind, die den Abbau der Ziel mRNA durch den Mechanismus der RNA-Interferenz induzieren.
- Ribozyme (siehe Abschnitt 1.3.3) und
- DNAzyme (siehe Abschnitt 1.3.4) sind RNA bzw. DNA Moleküle, die durch enzymatische Aktivität die Ziel-mRNA an spezifischen Stellen spalten können.

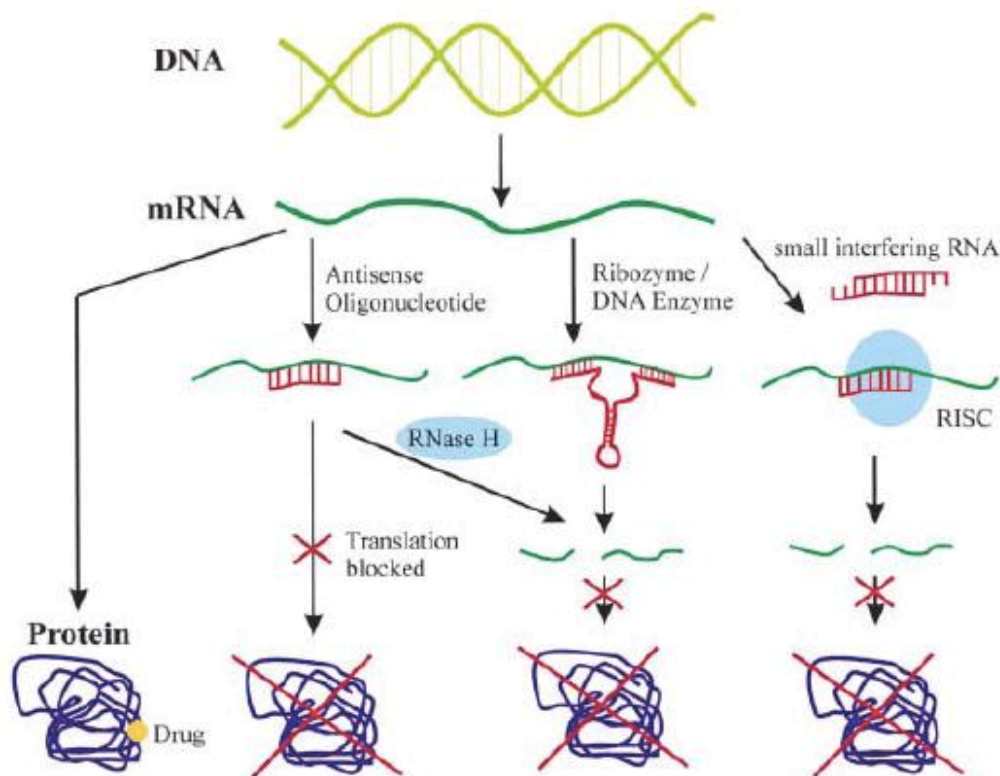


Abbildung 2: Wirkmechanismen von Antisense-Molekülen (Kurreck, 2003)

Konventionelle Medikamente greifen häufig an einem Protein an (links), wohingegen Antisense-Moleküle an die kodierende RNA binden. Antisense-Oligonukleotide verhindern eine Translation der mRNA oder induzieren ihren Abbau durch die RNase H. Ribozyme und DNAzyme besitzen katalytische Aktivität und spalten ihre Ziel-RNA. Bei der RNA-Interferenz wird durch siRNAs ein Abbau der Ziel-mRNA durch den RISC Komplex bewirkt.

1.3.1 Antisense-Oligonukleotide

Antisense Oligonukleotide (ASO) sind kurze einzelsträngige Desoxyribonukleotide. Sie sind komplementär zur Ziel-mRNA und hybridisieren durch Watson-Crick-Basenpaarung mit ihr. Dadurch wird eine spezifische Hemmung der Genexpression und Proteinsynthese hervorgerufen (Crooke, 2004). Die Inhibition kann dabei auf verschiedene Weise erzeugt werden (siehe Abbildung 2). So kann unter bestimmten Umständen durch die Bildung von ASO-mRNA Heteroduplexen die RNase H aktiviert

werden, die zu einer Degradation der mRNA führt, wobei jedoch das ASO intakt bleibt (Wu et al., 2004). Weitere, die Genexpression hemmende, Effekte sind die Störung der 5'-cap Bildung, die Inhibition der prä-mRNA sowie Spleißung und die sterische Hemmung der Translation am Ribosom (Chan et al., 2006; Kurreck, 2003).

1.3.2 RNA-Interferenz

Unter RNA-Interferenz (RNAi) versteht man ein Phänomen, bei dem durch Watson-Crick-Basenpaare kleine RNA Moleküle mit Abschnitten der Ziel mRNA interagieren und ihre Genexpression modulieren (Castanotto and Rossi, 2009). Bei dem zunächst im Nematoden *Caenorhabditis elegans* mit Doppelstrang-RNA gezeigten Effekt (Fire et al., 1998) stellte sich im Weiteren heraus, dass dieser auch in Säugetierzellen auftritt. Die Effektoren der RNAi sind sehr kurze Einzelstrang-RNA Moleküle (siRNA – *small interfering RNA*), die zuerst von Hamilton et al. (Hamilton and Baulcombe, 1999) beschrieben wurden. Diese siRNAs entstehen durch ein, der RNase-III ähnliches Enzym (DICER), welche sie aus Doppelstrang-RNA prozessiert. Die siRNA wird nun mit mehreren Proteinen in einem Komplex zusammengebracht (RISC – *RNA Induced Silencing Complex*). In diesem Komplex detektiert die siRNA die komplementäre Ziel-mRNA, die dann durch eine im Komplex eingebundene Ribonuklease gespalten wird (Sioud and Iversen, 2005).

1.3.3 Ribozyme

Ribozyme sind natürlich vorkommende RNA Moleküle mit enzymatischer Aktivität. In den frühen 80er Jahren wurden sie zuerst von Thomas R. Cech (Kruger et al., 1982) und Sidney Altman (Guerrier-Takada et al., 1983) beschrieben, wofür sie 1989 den Nobelpreis in Chemie erhielten (North, 1989).

Strukturell gibt es eine große Anzahl an verschiedenen Ribozymen. Ihre Komplexität reicht dabei von kleinen artifiziell erstellten Hammerhead-Ribozymen (siehe Abbildung 3) bis hin zu großen Ribozym-Proteinkomplexen wie beim Ribosom. Enzymatisch katalysieren Ribozyme spezifisch sowohl die Bildung als auch die Spaltung von Phosphodiester-Bindungen (Lewin and Hauswirth, 2001).

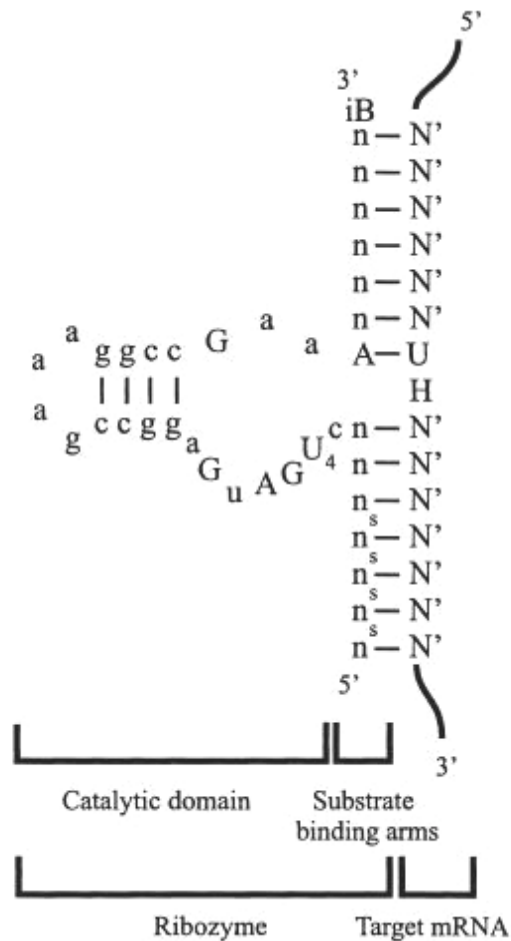


Abbildung 3: Sekundärstruktur eines Ribozyms (Kurreck, 2003)

rechts: Ziel mRNA. links: Ribozym mit zwei Substratbindungsstellen und katalytischer Domäne.

1.3.4 DNAzyme

Analog zu Ribozymen sind DNAzyme DNA-Oligonukleotide mit enzymatischer Aktivität. Sie wurden erstmals von Breaker et al. 1994 synthetisiert (Breaker and Joyce, 1994). Bis jetzt konnten jedoch keine natürlichen vorkommenden DNAzyme beschrieben werden. Es sind DNAzyme mit unterschiedlichen enzymatischen Funktionen bekannt, die entsprechend ihrer Funktion in Gruppen eingeteilt werden können. So gibt es neben RNA-spaltenden DNAzymen auch DNA-spaltende, DNA-ligierende DNAzyme und weitere mit phosphorylierender und adenylierender Funktion (Emilsson and Breaker, 2002).

Zur Untersuchung und Identifizierung effektiver RNA-spaltender DNAzyme wurde ein „*in vitro* Selektions-“ Verfahren verwandt. Dazu wurde ein Genpool aus 10^{16} DNA-Molekülen erstellt. Diese Moleküle wurden auf Ihre katalytische Aktivität hin

untersucht, aktive von inaktiven Molekülen getrennt und die aktiven Moleküle kloniert. Dieser Zyklus wurde mehrfach mit ansteigenden Anforderungen an die Aktivität wiederholt (Peracchi, 2005). Als besonders effektiv stellte sich dabei der 23. Klon des 10. Selektions-Zyklus heraus – das 10-23 DNAzym (Santoro and Joyce, 1997). Es besteht aus einer katalytischen Domäne die sich aus 15 Nukleotiden zusammensetzt, und zwei an diese angeschlossene, je ungefähr 8 Nukleotide große Substrat-Bindungs-Domänen (siehe Abbildung 4). Die Spaltung durch die katalytische Domäne erfolgt zwischen einem ungepaarten Purin und einem gepaarten Pyrimidin im Substrat. Die Substrat-Bindungs-Domänen interagieren per Watson-Crick Basenpaarung mit der Ziel-mRNA. Somit können beliebige RNA Moleküle gespalten werden, die eine Purin-Pyrimidin Bindung enthalten (Santoro and Joyce, 1998).

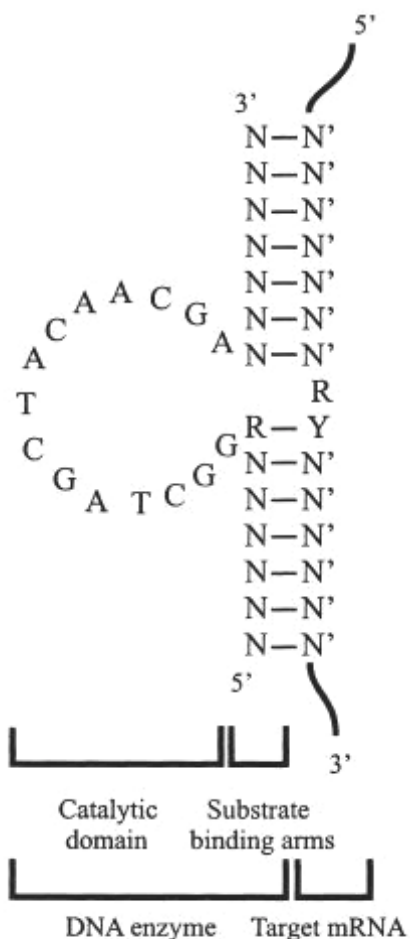


Abbildung 4: Sekundärstruktur eines 10-23 DNAzyms (Kurreck, 2003)

rechts: Ziel-mRNA mit Purin (R) und Pyrimidin (Y). links: DNAzym mit zwei Substratbindungsstellen und katalytischer Domäne.

Gegenüber den anderen Antisense-Strategien zeichnen sich DNAzyme durch mehrere Vorteile aus:

- Sie sind weniger anfällig für chemische und enzymatische Degradation als RNA basierte Antisense-Strategien (Akhtar et al., 2000).
- Sie sind einfach und günstig zu synthetisieren
- Sie haben, verglichen mit Hammerhead-Ribozymen, die höhere katalytische Aktivität (Kurreck et al., 2002).

DNAzyme stellen daher eine mögliche und interessante Antisense-Variante für das Zielmolekül GATA-3 dar. Ein solches GATA-3 spezifischen DNAzym wurde von unserer Arbeitsgruppe entwickelt, und erfolgreich für die Therapie eines alleregischen Asthma Tiermodells etabliert (Sel et al., 2008).

1.4 Die Aufnahme von therapeutischen Oligonukleotiden

Das Zielmolekül der DNAzyme, die mRNA, befindet sich im Zytoplasma und im Zellkern der Zielzelle. Um katalytisch wirksam werden zu können, müssen die DNAzyme somit in intaktem Zustand das Zytoplasma erreichen. Der Weg zu diesem Wirkort ist jedoch durch verschiedene Hindernisse erschwert.

Antisense-Moleküle sind, wie beschrieben, RNA und DNA Moleküle. Evolutionstheoretisch haben Zellen jedoch „kein Interesse daran“ Fremd-DNA/RNA aufzunehmen (Patil et al., 2005). So werden diese Moleküle bereits extrazellulär zügig von Exo- und Endonukleasen abgebaut. Aufgrund ihres polaren Rückgrats und ihrer Größe können Antisense-Moleküle die Zellmembran nicht spontan überwinden. Ebenfalls führt das negativ geladene Rückgrat zu einer Abstoßung von der negativ geladenen Zelloberfläche was eine endosomale Aufnahme nicht begünstigt. Mit zunehmender Molekülgröße nimmt dieser Effekt zu. Es wird jedoch angenommen, dass eine Rezeptor-vermittelte Endozytose erfolgt. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch nicht ausreichend verstanden (Thierry et al., 2003). Nach Aufnahme erfolgt eine Kompartimentierung in endosomale Vesikel. Diese können durch einen Chlorid-Protonen-Kotransporter von der Zelle auf einen pH-Wert von 5 bis 6 angesäuert werden, wodurch es zu einer sauren Hydrolyse der Ribonukleinsäuren kommen kann und katalytische lysosomale Enzyme aktiviert werden (Akhtar and Juliano, 1992).

Die beschriebenen Faktoren machen die Aufnahme von „nackten“ also unverpackten Antisense-Molekülen zu einem sehr ineffizienten Prozess. Trotzdem konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass auch nackte DNA von Zellen aufgenommen werden kann und in funktionellem Zustand das Zytoplasma erreicht (Meyer et al., 1995; Weiss, 2002). Bei dem Einsatz in der Lunge wurde argumentiert, dass unter Umständen das in den Alveolen ubiquitär vorkommende Surfactant als endogenes Transfektionsmittel fungiert und so die Aufnahme fördert (Leaman et al., 2002; Nyce and Metzger, 1997; Sel et al., 2008).

1.5 Surfactant

Das Surfactant (oder auch alveolar pulmonaler Surfactant) ist ein makromolekulares Aggregat, das sich aus Phospholipiden und Surfactant-Proteinen (SP) zusammensetzt. Seine wichtigste physiologische Funktion besteht darin, die Oberflächenspannung in den Alveolen herab zu setzen, und somit eine Blähung der Alveolen und den normalen Gasaustausch zu ermöglichen (Ikegami, 2006).

Man unterscheidet zwischen vier Surfactant Proteinen: Surfactant Protein A (SP-A) bis Surfactant Protein D (SP-D) (Curley and Halliday, 2001). SP-B und SP-C sind in Kombination mit den Phospholipiden wichtig für die Herabsetzung der Oberflächenspannung (Hawgood et al., 1998), SP-A und SP-D haben immunologische Funktionen (Kuroki and Sano, 1999). So spielt SP-A eine Rolle in der Opsonierung von *Staphylococcus aureus* (van Iwaarden et al., 1990) und Herpes Simplex Virus Typ I (van Iwaarden et al., 1991). Unter den Phospholipiden stellt gesättigtes Phosphatidylcholin den Hauptvertreter dar.

Surfactant wird von Typ II Alveolarzellen sezerniert (Rice and Singleton, 1988). Nach Sekretion bildet es eine Luft-Wasser-Oberfläche in der Alveole. Durch Zug und Druckbelastung in Folge der Atembewegung können sich kleine Lipid-Vesikel bilden, die nicht mehr zur Reduktion der Oberflächenspannung beitragen. Diese Vesikel werden präferentiell von Typ II Zellen und Makrophagen aufgenommen und einem Recycling in den Typ II Zellen zugeführt (Ikegami, 2006). Dabei ist der Metabolismus des Surfactants schnell. In Kaninchenlungen konnten Halbwertszeiten von 5 Stunden gemessen werden (Jacobs et al., 1982).

In der klinischen Medizin wird exogener Surfactant seit 1980 (Fujiwara et al., 1980) zur Therapie des frühkindlichen Atemnotsyndroms (Surfactantmangelsyndrom) eingesetzt. Dafür wird bei unreifen, frühgeborenen Säuglingen, deren Lunge in nicht ausreichender Menge Surfactant produziert dieser endotracheal substituiert (Sitzmann, 2002). Kommerziell werden unterschiedlich gewonnene Surfactant-Präparationen vertrieben. So zum Beispiel: synthetische, wie Exosurf®, aus zerkleinerten (Schweine-) Lungen extrahierte, wie Curosurf®, oder durch Bronchoalveoläre Lavage (von Rindern) gewonnene, wie Alveofact® (Halliday, 2005).

1.6 Vektorsysteme

Da die Aufnahme von „nackten“ Antisense-Molekülen, aber auch von Plasmiden, wie beschrieben, problematisch ist, hat sich in den letzten Jahren ein Forschungsschwerpunkt mit der Zielsetzung etabliert, neue Verfahren zu entwickeln die den Transport dieser Moleküle verbessern.

Die dabei entstandenen Techniken können in drei Gruppen gegliedert werden:

- Vektorielle Systeme bei denen zum Beispiel Viren oder kationische Polymere als „Transporter“ eingesetzt werden.
- Mechanische Systeme, wie zum Beispiel die Mikroinjektion (Capecchi, 1980) und die Bioballistik (Vassilev et al., 2001).
- Elektrische Systeme, wie die Elektroporation (Yan et al., 1998).

Mechanische und elektrische Methoden werden hauptsächlich für die Transfektion *in vitro* eingesetzt, obwohl es auch Versuche mit Elektroporation *in vivo* gibt (Heller and Heller, 2006). Daher bieten sich für den *in vivo* Einsatz vor allem vektorielle Methoden an.

Virale Vektoren: Für den Gentransfer in Zellen werden verschiedene Viren verwendet. Unter anderem finden Retroviren, Adenoviren und Adeno-ähnliche Viren Einsatz. Virale Vektoren haben den Vorteil, dass mit ihnen relativ hohe Transfektionseffizienzen erreicht werden können. Ihnen haften aber auch einige Limitationen an, die ihren

praktischen Nutzen einschränken. So gibt es Bedenken bei der Sicherheit viraler Vektoren, da sie besonders bei mehrfachem Einsatz *in vivo* das Immunsystem stimulieren und somit unerwünschte Reaktionen hervorrufen können (Yang et al., 1994), aber auch ihre Transfektionseffizienz herabsetzen. Auch kann die Replikation der Viren im Körper nicht immer ausgeschlossen werden. Zusätzlich besteht bei Retroviren die Gefahr einer malignen Entartung. Des Weiteren ist die Kapazität, mit der sie DNA übertragen können beschränkt und mit ihrem Einsatz sind hohe Kosten verbunden (Weiss, 2002).

Non-Virale Vektoren: Zu den non-viralen Vektoren gehören verschiedene synthetische Moleküle, wobei besonders die verschiedenen kationischen Liposomen und kationische Polymere hervortreten, da mit ihnen die höchsten Transfektionseffizienzen erreicht werden konnten (Godbey et al., 1999). Den beiden Methoden ist gemeinsam, dass sie DNA und RNA über ionische Wechselwirkungen binden und ihre Aufnahme in die Zelle fördern. Dabei interagieren die anionischen Phosphatgruppen im Rückgrat der Ribonukleinsäuren mit kationischen Gruppen der Liposomen oder der Polymere, was zu einer Komplexbildung führt (Luo and Saltzman, 2000).

Durch die Komplexbildung wird die DNA vor enzymatischem Abbau geschützt, durch die anionischen Gruppen die Interaktion mit der Zellmembran gefördert.

Lipoplexe: Als Lipoplexe bezeichnete man Komplexe, die aus kationischen Liposomen und DNA oder RNA gebildet werden. Lipoplexe werden seit Anfang der 1990er Jahre für die Transfektion eingesetzt. Zu dieser Gruppe gehört **DOTAP** (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfat) - ein Liposom, das kommerziell erhältlich ist. Es wird zur Transfektion von RNA, DNA, Oligonukleotiden und Ribonukleoproteinen eingesetzt. Aufgrund des zytotoxischen Potentials erfolgt die Anwendung hauptsächlich *in vitro*. Der Einsatz von DOTAP für die *in vivo* Anwendung wird aber diskutiert (Kwon et al., 2008).

Polyplexe: Unter einem Polyplex versteht man die auf elektrostatischer Wechselwirkung beruhende Verbindung eines Polymers mit einem DNA- oder RNA-Molekül (Beyerle et al., 2010b). Prominenter Vertreter dieser Gruppe ist **Polyethylenimin (PEI)**. PEI ist ein Polymer, dessen Rückgrat aus zwei Kohlenstoffatomen und einem Stickstoffatom besteht (Summenformel C_2H_5N ; siehe

auch Abbildung 5) Er enthält in verzweigt-kettiger Form primäre, sekundäre und tertiäre Amino-Gruppe, die alle, abhängig vom pH-Wert der Umgebung, protoniert werden können (siehe auch Abbildung 6) (Suh et al., 1994). Da jedes dritte Atom im Rückgrat des PEI ein protonierbarer Stickstoff ist, verfügt der Polymer über eine hohe kationische Ladungsdichte (Neu et al., 2005).

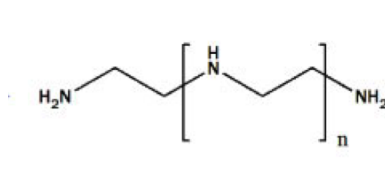


Abbildung 5: Sekundärstruktur eines linearen PEI-Polymers

Abgebildet ist ein lineares PEI-Polymer mit sekundären und terminal primären Aminogruppen.

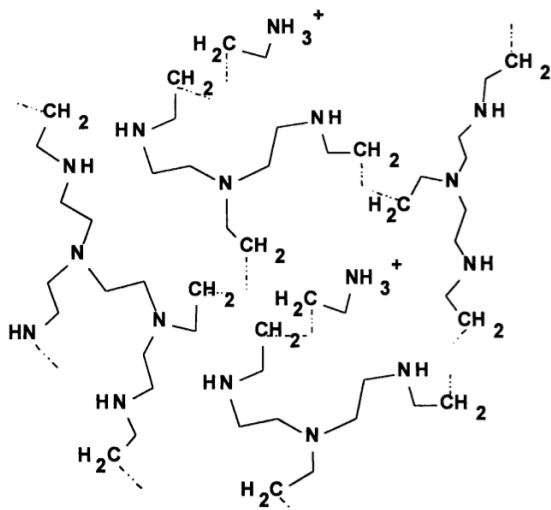


Abbildung 6: Sekundärstruktur eines verzweigt-kettigen PEI-Polymers (Ungaro et al., 2003)

Abgebildet ist ein verzweigt-kettiges PEI-Polymer mit primären, sekundären und tertiären Aminogruppen.

Die Aminogruppen sind unter physiologischen Umständen positiv geladen und interagieren über elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA, was zu Ausbildung von stabilen Komplexen führt. PEI ist in linearer (siehe Abbildung 5) und in verzweigt-kettiger Struktur synthetisierbar (siehe Abbildung 6). Das Molekulargewicht liegt zwischen <1 kDa und $1,6 \times 10^3$ kDa. Die für die Transfektion eingesetzten PEI-Moleküle haben eine Masse zwischen 3 kDa und 25 kDa. Kleinere Moleküle zeigen schlechte Transfektionseigenschaften, größere führen zu vermehrter Zytotoxizität (Fischer et al., 2003b). Die Komplexbildung führt zu einem Degradationsschutz von DNA und RNA (Brus et al., 2004). Im Experiment zeigten sich

Verlängerungen der Abbau-Zeit von 2 Minuten bei nackter DNA durch DNase H auf über 30 Minuten bei PEI-DNA-Polyplexen (Moret et al., 2001). Ebenso wird die Interaktion mit der anionischen Zelloberfläche gefördert, was die endosomale Aufnahme fördert. Für die Erklärung des zytoplasmatischen Transports wurde von Behr die „Proton Sponge Hypothese“ postuliert (Boussif et al., 1995), die weithin akzeptiert wird (Neu et al., 2005). Demnach puffert PEI mit seiner Vielzahl von Aminogruppen die ins Endosom transportierten Protonen ab. Die kotransportierten Chlorid-Ionen führen zu einer Erhöhung des osmotischen Drucks, welche zur Schwellung und Ruptur des Endosoms führt. Dadurch erfolgt die Freisetzung des Polyplexes in das Zytoplasma (Kamiya et al., 2001). Sowohl für den Einsatz *in vitro* als auch *in vivo* wird PEI als effektiver Vektor beschrieben (Boussif et al., 1995; Goula et al., 1998). Ein wesentlicher Nachteil ist jedoch die Zytotoxizität von PEIs. Mit der Annahme, dass die Ladung der an der Oberfläche befindlichen Aminogruppen des PEI-Aggregats eine Hauptursache für seine toxischen Eigenschaften darstellt, wird versucht, diese Aminogruppen zu kapseln. So konnte gezeigt werden, dass eine Verknüpfung mit nicht ionischen hydrophilen Polymeren die Zytotoxizität *in vitro* und *in vivo* senkt (Ogris et al., 1999; Petersen et al., 2002a). Hierfür bietet sich zum Beispiel die Verwendung von Polyethylen-Glycol (PEG) (Nguyen et al., 2000) oder poly [N-(2-hydroxypropyl) methacrylamid) (Fisher et al., 2000). Durch eine PEGylierung kann eine sterische Abschirmung des PEIs erreicht werden.

Die PEGylierung (vgl. Abbildung 7) senkt nicht nur die Zytotoxizität, sondern verbessert auch die Löslichkeit (Kichler et al., 2002), verringert die Aggregation der Komplexe (Tang et al., 2003), senkt unspezifische Interaktionen mit Proteinen in physiologischen Flüssigkeiten (Tang et al., 2003), mindert die Aktivierung des Komplementsystems (Finsinger et al., 2000) und erhöht die Zirkulationszeit im Blut (Kircheis et al., 2001; Merdan et al., 2002; Ogris et al., 1999). Auf die Transfektionseffizienz wirkt sich eine PEGylierung anscheinend ebenfalls positiv aus. Mao et al. (Mao et al., 2006) und Zhang et al. (Zhang et al., 2008) beschreiben eine *in vitro* gesteigerte Transfektionseffizienz von PEI mit bestimmten PEG Seitenketten gegenüber unmodifiziertem PEI. Dabei wurde argumentiert, dass dies unter Umständen mit einer verbesserten Freisetzung der Ribonukleinsäure aus den Polymeren im Zytoplasma zusammenhängt (Mao et al., 2006).

1.7 Hypothesen und Zielsetzung der Arbeit

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit ist die beschriebene Therapie einer allergischen Atemwegsentzündung im Tiermodell mittels eines GATA-3 spezifischen DNAzyms. Die Wirksamkeit dieser Therapie konnte für die Applikation von „nackten“ DNAzymen gezeigt werden (Sel et al., 2008). Jedoch ist diese Applikationsform möglicherweise suboptimal. Die vorliegende Arbeit geht daher der Frage nach, ob Surfactant oder künstliche Vektoren die Aufnahme und Wirksamkeit von GATA-3 spezifischen DNAzymen verbessern.

Es wurden dazu folgende Fragestellungen bearbeitet:

Verbessert Surfactant die Aufnahme von DNAzymen *in vitro*?

Verbessern PEI-PEG Polymere die Aufnahme von DNAzymen *in vitro*?

Welche PEI-PEG Konstrukte bieten die höchste Transfektionseffizienz?

Verbessern PEI-PEG Polymere die Wirksamkeit *in vivo*?

2 Material und Methoden

2.1 Polyplexe und Lipoplexe

Die verwendeten PEI-Polymere wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Kissel (Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Marburg) zur Verfügung gestellt.

Bei den Polymeren handelt es sich ausschließlich um PEI mit einem Molekulargewicht von 25 kDa. Neben reinem PEI 25 kDa, wurden vier verschiedene PEI Polymere mit Poly(Ethylen-Glykol) (PEG) Seitenketten verwendet (siehe Abbildung 7). Ihre Synthese wurde von Petersen et al. beschrieben (Petersen et al., 2002a; Petersen et al., 2002b). Hierbei wurde auf konstantes Verhältnis der Masse von PEI zu PEG mit einem PEI Anteil von ungefähr 50% gewählt. Die Polymere wurden mit folgender Nomenklatur bezeichnet: PEI(25kDa)-g-PEG(X)_n. Dabei gibt der eingeklammerte Wert (hier 25 kDa bzw. x) das Molekulargewicht des verwendeten PEI bzw. PEG Polymers an. Mit dem Index n wird die durchschnittliche Anzahl an PEG Seitenketten pro PEI Molekül bezeichnet.


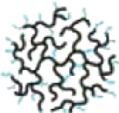
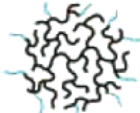
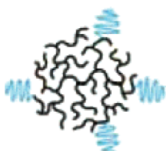
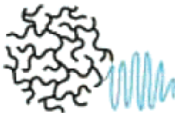
Compound	PEI	PEI (25k)-g- -PEG(550) ₃₀	PEI(25k)-g- -PEG(2k) ₁₀	PEI(25k)-g- -PEG(5k) ₄	PEI(25k)-g- -PEG(20k) ₁
PEI content	100%	60%	55%	55%	55%
Mw PEI	25000	25000	25000	25000	25000
Mw PEG		550	2000	5000	20000
Mw	25000	41500	45000	45000	45000
Structure					

Abbildung 7: Aufbau der verwendeten PEI-PEG Polymere (Mao et al., 2006)

Schematisch dargestellt sind von links nach rechts: PEI (25kDa), PEI (25kDa)-g-PEG(550Da)₃₀, PEI (25kDa)-g-PEG(2kDa)₁₀, PEI (25kDa)-g-PEG(5kDa)₄, PEI (25kDa)-g-PEG(20kDa)₁, jeweils mit ihrer Masse, der Masse des PEI Anteils und der Masse der einzelnen PEG-Seitenketten.

PEI bzw. PEI-PEG Moleküle bilden spontan Komplexe mit RNA bzw. DNA (Polyplexe). Zur Herstellung der gewünschten Polyplexen wurden daher die berechneten Mengen Polymer und DNA (siehe 2.1.1) gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.1.1 Berechnung des N/P Verhältnisses

Wichtig für die Untersuchung von PEI-Polyplexen ist das Verhältnis von Polymer zu DNA, aus dem unterschiedliche Eigenschaften in Bezug auf Größe und Ladung resultieren, welche wiederum die Transfektionseffizienz und Toxizität beeinflussen. Diese unterschiedliche Zusammensetzung wird als Stickstoff/Phosphat Verhältnis (N/P-Verhältnis) angegeben. Dabei wird der relative Anteil von Aminogruppen im PEI-Teil auf die Anzahl der Phosphatgruppen der RNA/DNA des Polyplexes angegeben. Die Masse der PEG Seitenketten wird nicht in die Berechnung mit eingezogen, da sie nicht für die Bindung der DNA sorgt. Beispielhaft dafür ergibt sich die folgende Rechnung zum N/P Verhältnis von PEI zum GATA-3 spezifischen DNAzym hgd40, das selbst ein Molekulargewicht von 10972,98 Da besitzt:

$$\begin{array}{l}
 N/P = \frac{\text{Aminogruppen}_{PEI}}{\text{Phosphatgruppen}_{DNA}} \quad \left| \quad \begin{array}{l} \text{Aminogruppen}_{PEI} [mol] = \frac{m_{PEI} [g]}{M_{PEI} [g/mol]} \\ \text{Phosphatgruppen}_{DNA} [mol] = 33 \times \frac{m_{hgd40} [g]}{M_{hgd40} [g/mol]} \end{array} \right. \\
 \\
 N/P = \frac{m_{PEI} [g]}{m_{hgd40} [g]} \times \frac{M_{hgd40} [g/mol]}{33 \times M_{PEI} [g/mol]} \quad \left| \quad \begin{array}{l} M_{PEI} = 43,07 [g/mol] \\ M_{hgd40} = 10972,98 [g/mol] \end{array} \right. \\
 \\
 N/P = \frac{m_{PEI} [g]}{m_{hgd40} [g]} \times 7,72
 \end{array}$$

2.1.2 Messung der Partikelgröße und des Zeta-Potentials

Die Partikelgröße wurde durch dynamische Lichtstreuung bestimmt. Bei dieser Methode wird die Probe durch einen Laser bestrahlt, und das entstehende Streulicht

analysiert. Durch die Brown'sche Molekularbewegung fluktuiert dabei die Intensität des Streulichts, woraus sich die Geschwindigkeit, der in Lösung befindlichen Teile und abgeleitet davon ihre Größe berechnen lässt (Murphy, 1997).

Das Zeta-Potential ist (vereinfacht) ein Maß für die Oberflächenladung eines Partikels in einer Suspension (vgl. auch: (Kirby and Hasselbrink, 2004)). Für die Messung des Zeta-Potentials wurde an die Probensuspension des Polyplexes ein wechselndes elektrisches Feld angelegt und die Geschwindigkeit der gelösten Polyplexe durch Laser-Doppler-Anemometrie bestimmt.

Beide Messungen wurden jeweils mit Proben-Triplets an einem „Zetasizer Nano ZS“ durchgeführt. Dafür wurden nach Komplexierung von PEI und DNA die Polyplexe für 10 Minuten inkubiert und auf ein Endvolumen von 800µl in HEPES-Puffer (50mM, pH 7,4) verdünnt.

Material	Bezugsquelle
HEPES-Puffer	Sigma, Taufkirchen, D
Zetasizer Nano ZS	Malvern, Herrenberg, D

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden sowohl humane Lungenepithel- (A549, BEAS-2B) und T-Zell-Linien (Jurkat, Molt-4) als auch murine Lungenepithel- (LA-4) und T-Zell-Linien (EL4) eingesetzt.

A549: A549 ist eine humane adhärente Lungenepithelzelllinie. Sie wurde 1972 aus Bronchialkarzinomgewebe eines 58-jährigen Patienten gewonnen und stellt ein etabliertes Modell für Lungengewebe dar. Die Zelllinie zeigt viele Eigenschaften von Typ II Alveolarzellen (Roggen et al., 2006).

BEAS-2B: Die BEAS-2B Zelllinie ist eine humane Lungenepithelzelllinie. Sie wurde aus nicht-kanzerösem Lungenbiopsat gewonnen und mit Papoviren transformiert (Reddel et al., 1988).

Jurkat: Bei der Jurkat Zelllinie handelt es sich um eine T-Zelllinie, die aus Blut eines 14 jährigen Leukämie Patienten gewonnen wurde (Schneider et al., 1977).

Molt-4: Bei Molt-4 handelt es sich um eine humane T-Lymphoblasten-Zelllinie. Sie wurde 1972 aus einem Patienten im Rezidiv einer akuten lymphatischen Leukämie gewonnen (Sahai Srivastava and Minowada, 1973).

LA-4: Bei der LA-4 Zelllinie handelt es sich um Zellen, die den alveolaren Pneumozyten Typ II ähneln. Sie wurden aus einem murinen Lungenadenom erzeugt. Ihre Erstbeschreibung erfolgte im Jahre 1975 (Stoner et al., 1975).

EL-4: Die EL-4 Zelllinie ist eine murine T-Lymphozyten-Zelllinie, die aus einem induzierten Lymphom gewonnen wurde.

Material	Bezugsquelle
A549, Zelllinie	ATCC, Wesel, D
BEAS-2B, Zelllinie	ATCC, Wesel, D
Jurkat, Clone E6-1, Zelllinie	ATCC, Wesel, D
Molt-4, Zelllinie	ATCC, Wesel, D
LA-4, Zelllinie	ATCC, Wesel, D
EL-4, Zelllinie	ATCC, Wesel, D

2.2.2 Kultivierung der Zellen

A549, BEAS-2B, Jurkat, Molt-4 und EL-4 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert, dem 10% FCS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden. Die EL-4 Zellen wurden in F-12 Kaighn's Nutrient Mixture kultiviert, dem 10% FCS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden. Die Bebrütung erfolgte für alle Zellen bei 37°C und 5% CO₂.

Subkultivierung der Suspensionzelllinien

Für die Subkultivierung der Suspensionzelllinien: Molt-4, Jurkat und EL-4 wurden 1 ml der Zelllösung in eine sterile 75 ml Zellkulturflasche gegeben und mit 19 ml Medium verdünnt.

Subkultivierung der adhärenen Zelllinien

Die adhärenen Zelllinien: A549, BEAS-2B, LA-4 wurden nach folgendem Schema subkultiviert: Zunächst wurde das Medium der Zellen abgesaugt und die Zellen einmal mit 10 ml PBS (21°C) gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin-EDTA (1x) (21°C) von der Zellkulturflasche abgelöst. Dieser Vorgang wurde nach circa 8 min mikroskopisch überprüft. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 10 ml Medium gelöst. 4 ml der Zellsuspension wurden in eine sterile 75 ml Zellkulturflasche gegeben und mit 16 ml Medium verdünnt.

Material	Bezugsquelle
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Parschauing, A
Gibco® F-12 Kaighn's Nutrient Mixture	Invitrogen, Paisley, UK
Fetales Kälberserum (FCS) Gold	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Penicillin / Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Parschauing, A
Trypsin-EDTA (1x) (0,5 % / 0,2% in PBS)	PAA Laboratories GmbH, Parschauing, A
Zellkulturflasche nunclo TM 75cm ²	Nunc, Roskilde, DK
Kühlzentrifuge BIOFUGE fresco	Kendro, Langenselbold, D

2.2.3 Zellzählung

Die Zellzählung wurde mit einem Cell-Counter durchgeführt (CASY, Schärfe Systems). Dabei wurde die zu bestimmenden Zellsuspensionen mit einer gerätespezifischen Elektrolytlösung (CASY TON) verdünnt. Die Verdünnung sowie andere Messparameter waren dabei abhängig von der Zelllinie.

Die Zellzählung im Cell-Counter beruht auf folgendem Prinzip: Während der Messung wird über die Messkapillare ein Spannungsfeld erzeugt, wobei die elektrolytgefüllte Kapillare einen definierten elektrischen Widerstand darstellt. Sobald die Zellen der zu messenden Probe in die Messkapillare gesaugt werden, verdrängen sie dort eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung, wodurch es zu einer Erhöhung des Widerstandes über die Kapillarstrecke kommt. Diese Widerstandsänderung verhält

sich proportional zum Volumen der Zellen. Hieraus kann die Gesamtzellzahl berechnet werden, da die durchschnittlichen Volumina der verschiedenen Zelltypen bekannt sind.

Material	Bezugsquelle
CASY® TON	Schärfe Systems, Reutlingen, D
CASY® Model TT (Cell Counter, Analyser System)	Schärfe Systems, Reutlingen, D

2.3 Durchflusszytometrische-Analysen

Die Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) stellt eine Methode dar, um Zellen mittels zellgebundener Fluoreszenzfarbstoffe auf Einzelzellebene zu analysieren.

Im FACS werden die sich in der Messprobe befindlichen Zellen einzeln durch eine spezielle Kapillare befördert und durch den Lichtstrahl ein oder mehrerer Laser geführt. Das von den Zellen gestreute Laserlicht wird dabei detektiert und analysiert. Daraus ergeben sich die Messgrößen *Forward Scatter* (FSC) und *Sideward Scatter* (SSC). Der *Forward Scatter* liefert Informationen über die Größe der Zellen, der *Sideward Scatter* über ihre Granularität. In Kombination erlauben die beiden Parameter ein Abschätzen von Vitalität und Zelltyp der untersuchten Zellen. Neben der Messung von FSC und SSC können im FACS Fluoreszenzfarbstoffe, die beispielsweise über Antikörper an zelluläre Strukturen gebunden sind, zur Emission angeregt werden. Die gewonnenen Informationen befinden sich dabei auf der Ebene einzelner Zellen, so dass man für jede gemessene Zelle einen Datensatz aus FSC, SSC und Leuchtstärke der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe erhält, welche mit ihrer Dosis korreliert. Für die Analyse der Transfektion *in vitro* wurden DNAsen mit endständiger 6-Carboxyfluorescein (FAM)-Markierung eingesetzt. Die Messung im FACS erlaubte dabei Rückschlüsse auf die Menge des von den Zellen aufgenommenen DNAsens.

Kultivierung der Zellen

Für die Analyse im FACS wurden die Zellen aus den Zellkulturflaschen geerntet und ihre Zellzahl bestimmt (siehe 2.2.3). Sowohl für adhärenzte als auch für Suspensionszelllinien wurden auf einer 24-Well-Platte je 5×10^4 Zellen in 500 µl Medium ausgesät und 24 Stunden bei 37° C und 5% CO₂ kultiviert.

Transfektion der Zellen

Für die Transfektion der Zellen wurden zunächst die PEI/DNA- bzw. DOTAP/DNA-Komplexe gebildet. Für die Komplexbildung der PEI/DNA-Polymerkomplexe wurden die nach dem beschriebenen Schema (2.1.1) berechneten Mengen DNA und Polymer in ein steriles 500 µl Reagenzgefäß pipettiert und vorsichtig vermischt. Dieses Gemisch wurde für 20 min im Dunkeln und bei Raumtemperatur inkubiert. Für die DOTAP/DNAzym-Komplexierung wurden die DOTAP-Lösung mit HBS Puffer verdünnt und dann zusammen mit der verwendeten DNA in ein steriles 500 µl Reagenzgefäß pipettiert. Nach vorsichtigem Mischen wurde dieses Gemisch ebenfalls bei Raumtemperatur für 20 Minuten stehen gelassen. Beide Ansätze wurden mit der entsprechenden, im Versuch eingesetzten, erforderlichen Menge Kulturmedium verdünnt. Das Medium der Zellen wurde abgesaugt und durch die Medium/DNA-Komplexlösung ersetzt. Die Transfektionen wurden, wenn nicht anders dargestellt, über 24 Stunden ohne einen weiteren Austausch des Mediums durchgeführt.

Analyse der Zellen im FACS: Für die Analyse im FACS wurden die Zellen aus den 24-Well-Platten geerntet und in FACS-Tubes überführt. Diese wurden bei 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 350 µl PBS resuspendiert. Bei der FACS-Messung wurden 10^4 Zellen analysiert und ihre Daten in einer Punktwolke dargestellt. Zunächst wurden die Zellen in vital und nicht vital eingeteilt. Dafür wurde eine Spanne für die Größe (Forward Scatter (FSC)) der Zelle und ihre Granularität (Sideward Scatter (SSC)) festgelegt (siehe „Gate R1“ Abbildung 8). Die im „Gate R1“ befindlichen Zellen wurden anschließend weiter analysiert.

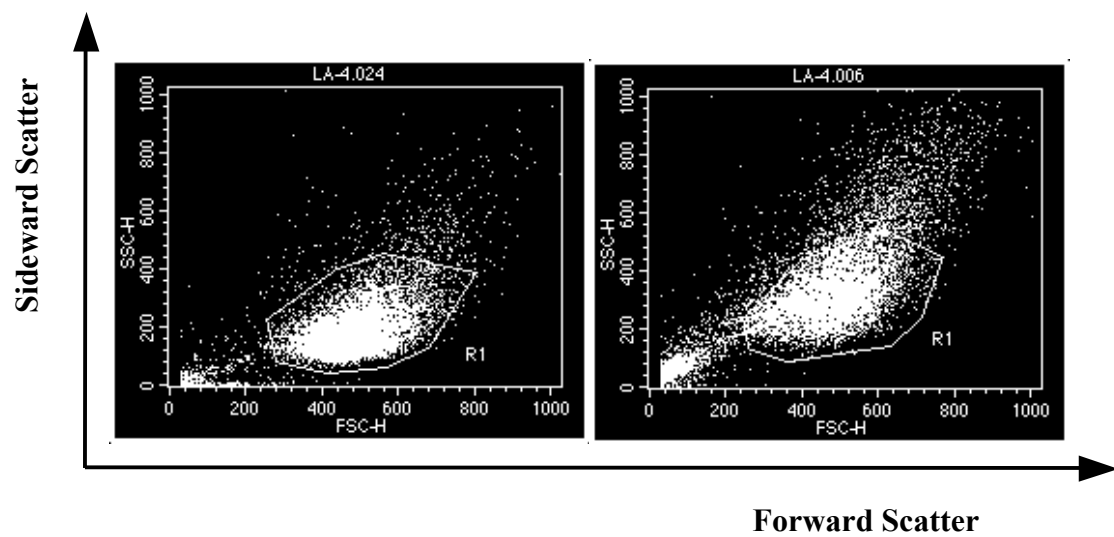


Abbildung 8: Darstellung zwei verschiedener LA-4 Zellpopulationen in Forward und Sideward Scatter

Zu sehen ist die Punktwolken-Darstellung der Zellen und das Gate R1. Auf der linken Darstellung befinden sich 90,2% der Zellen innerhalb des Gates (90,2% vitale Zellen), auf der rechten Darstellung befinden sich 66,9% der Zellen innerhalb des Gates (66,9% vitale Zellen).

Diese wurden nun in einem Histogramm dargestellt, bei dem auf der Ordinate die Stärke der Fluoreszenz und auf der Abszisse die Anzahl der Zellen mit eben dieser Fluoreszenzstärke dargestellt wurden.

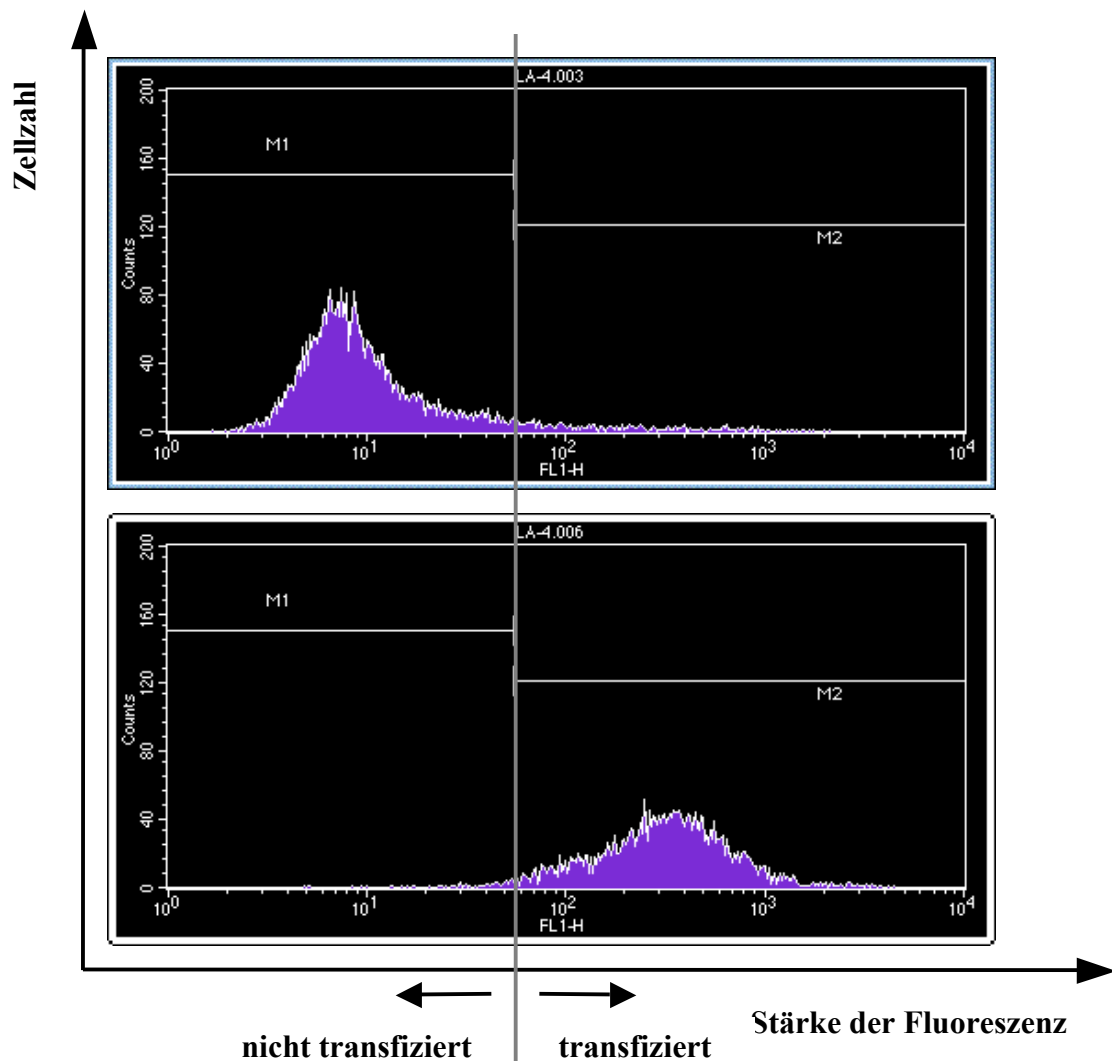


Abbildung 9: Beispiel für die Einteilung in „transfizierte“ und „nicht transfizierte“ Zellen

Dargestellt sind zwei Histogramme, die jeweils die Fluoreszenz im FITC-Kanal darstellen (in dem der FAM-Farbstoff detektiert wird). Die obere Graphik zeigt dabei eine Negativkontrolle, die mit FAM-markiertem DNAsym aber ohne Transfektionsmittel inkubiert wurden. Dabei befindet sich die Mehrzahl der Zellen im Gate M1, wenige Zellen im Gate M2. Zellen im Gate M1 werden im Weiteren als „nicht transfiziert“, Zellen im Gate M2 als „transfiziert“ bezeichnet. Die untere Graphik zeigt im Gegensatz dazu eine Positivkontrolle, bei der die Zellen mit DOTAP und FAM-DNAsym transfiziert wurden.

Anhand dieses Histogramms wurde eine Einteilung in „transfizierte“ und „nicht transfizierte“ Zellen vorgenommen. Dabei wurden alle Zellen mit einer Fluoreszenzstärke größer X als transfiziert definiert. Alle Zellen mit einer Fluoreszenzstärke kleiner X als nicht transfiziert betrachtet (siehe Abbildung 9). Der Wert für X wurde anhand der Negativkontrolle festgelegt. Als weitere Methode zur Auswertung wurde anstelle der Einteilung der Zellen in „transfiziert“ und „nicht transfiziert“ die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellen miteinander verglichen.

Dieser Ansatz lieferte eine zusätzliche quantitative Aussage, die vor allem benötigt wurde, um gut transfizierte Zellpopulationen hinsichtlich der Menge des aufgenommenen DNAzyms zu vergleichen.

Material	Bezugsquelle
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Parschauing, A
Gibco® F-12 Kaighn's Nutrient Mixture	Invitrogen, Paisley, UK
DOTAP	Roche, Mannheim, D
PEI (25kDa)	AG Kessel, Marburg, D
PEI (25kDa)-g-PEG(550Da)30	AG Kessel, Marburg, D
PEI (25kDa)-g-PEG(2kDa)10	AG Kessel, Marburg, D
PEI (25kDa)-g-PEG(5kDa)4	AG Kessel, Marburg, D
PEI (25kDa)-g-PEG(20kDa)1	AG Kessel, Marburg, D
Alveofact® Trockenampulle	Lyomark Pharma GmbH, München, D
Curosulf® Trockenampulle	Cornestone Therapeutics, New York, USA
hgd40-FAM Sequenz 5' zu 3': [6-FAM]GTGGATGGAGGCTA-GCTACAACGAGTCTTGGAG [dT-rev-Q]	Operon, Köln, D
Gd21-FAM Sequenz 5' zu 3': [6-FAM]AGGACGGGAGGCTAGCT-ACAACGAGTGGTTGCC [dT-rev-Q]	Operon, Köln, D
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Parschauing, A
HBS-Puffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4)	Sigma, Taufkirchen, D
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure	Sigma, Taufkirchen, D
Natrium-Chlorid (NaCl)	Sigma, Taufkirchen, D
Nunclon™ Surface, 24 Well Zellkulturplatte	Nunc, Roskilde, DK
Flow Cytometry Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, D
FACSort	BD, Franklin Lakes, USA
CellQuestPro	BD, Franklin Lakes, USA

2.4 Konfokale Mikroskopie

Um Aussagen über die Lokalisation der DNAzyme nach der Aufnahme in die Zelle machen zu können, wurde die konfokale Laserscanning-Mikroskopie eingesetzt (CLSM, *Confocal Laser Scanning Microscopy*). Bei dieser speziellen Mikroskopiervariante wird jeweils nur ein sehr schmaler, in der Fokalebene liegender Bereich in relativ guter Auflösung dargestellt. Durch Verschieben der Fokalebene können so digitale Schnittbilder produziert werden, aus denen man dreidimensionale Ortsangaben ableiten kann. In Kombination mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen insbesondere mit denen, die an das zu untersuchende DNAzym und verschiedene zelluläre Strukturen gekoppelt sind, erhält man Informationen über die intrazelluläre Aufnahme der DNAzyme.

Kultivieren der Zellen

Für die Analyse im CLSM wurden ausschließlich LA-4 Zellen verwendet. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden je 5×10^4 Zellen in 1,2 ml RPMI 1640 Medium suspendiert und in 2 Well Chamberslides kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion nach Versuchsschema.

Transfektion der Zellen

Die Transfektion wurde analog zu den Transfektionschemata in der FACS-Analyse durchgeführt (siehe 2.3).

Fixieren der Zellen

Zum Zeitpunkt $t=48$ h erfolgte die Fixierung der Zellen. Hierzu wurden sie drei Mal mit 1,2 ml PBS gewaschen; dann für 20 Minuten mit 1,2 ml Paraformaldehyd-Lösung (3%) inkubiert. Nach Absaugen des Fixans wurden die Zellen erneut drei Mal mit 1,2 ml PBS gewaschen und dann je nach Versuch gefärbt.

Färbung der Zellkerne

Für die Färbung der Zellkerne wurden die Zellen nach dem Fixieren für 20 Minuten im Dunkeln mit DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol, Dihydrochlorid) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit 1,2 ml PBS gewaschen.

Färbung der Lysosomen

Für die Anfärbung der Lysosomen wurde das Lysotracker blue-Kit verwendet. Dabei wurden 1,2 ml der 50 nM Lösung des Farbstoffes auf die Zellen gegeben und diese zusammen für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen drei Mal mit 1,2 ml PBS gewaschen.

Einbettung der Zellen

Für die Einbettung der Zellen wurden die Aufsätze der Chamberslides entfernt und ca. 20 μ l PBS/Glycerol (42%) auf die Zellen geben. Die Deckgläser wurden aufgesetzt, die überstehende Flüssigkeit mit Zellstoff entfernt und das Deckglas mit Nagellack fixiert.

Analyse im CLSM

Nach dem Einbetten der Zellen wurden die Objektträger gekühlt und lichtgeschützt aufbewahrt und innerhalb von 24 Stunden im CLSM analysiert.

Material	Bezugsquelle
LysoTracker blue	Invitrogen, Karlsruhe, D
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol, Dihydrochlorid)	Molecular Probes, Eugene, USA
Glycerol 99%	Sigma, Taufkirchen, D
Nagellack	Jofrika Karneval, D
Chamberslides 2 Well	LAB-TEK, Nalg Nunc International, USA
Deckglas	Menzel Gläser, Braunschweig, D
Axiovert 100 M Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, D
LSM 510 Scanning Device	Zeiss, Oberkochen, D

2.5 Tierexperimientelle Analysen

Für das durchgeführte Tiermodell wurden sechs bis acht Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden in einem belüfteten Käfigsystem bei 20°C Raumtemperatur gehalten. Es wurde ein künstlicher Hell-Dunkel Rhythmus von je 12 Stunden erzeugt. Die Tiere erhielten Standardfutter und Wasser als Ernährung.

2.5.1 Sensibilisierung und lokale Allergenprovokation

Um *in vivo* die Behandlung von Asthma zu untersuchen, ist ein entsprechendes Tiermodell nötig, das einen Asthma-ähnlichen Phänotyp erzeugt. In diesem Versuch wurde ein gut etabliertes Modell verwendet, das in der Lunge eine dem Asthma bronchiale entsprechende allergischen Entzündung erzeugt (Wegmann et al., 2005).

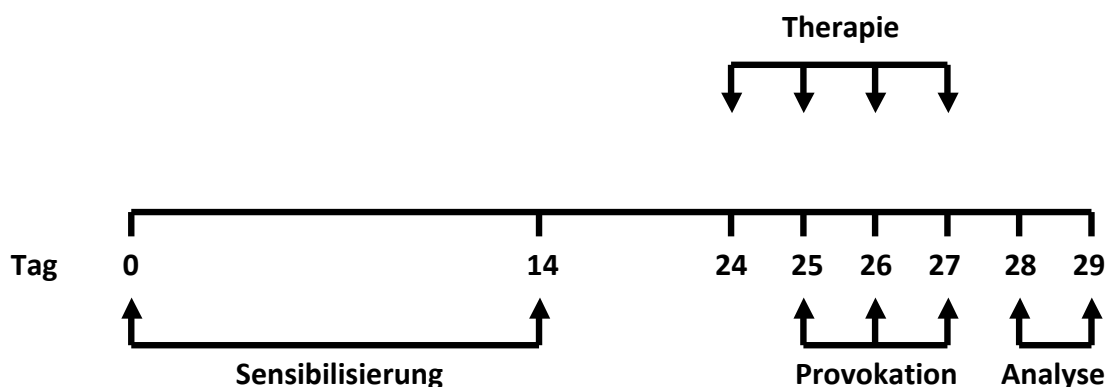


Abbildung 10: Zeitlicher Ablauf des durchgeführten Tierversuchs

An Tag 0 und Tag 14 wurden die Versuchstiere i.p. mit OVA-Protein und Adjuvants immunisiert („Sensibilisierung“). An den Tagen 24 bis 27 erfolgte jeweils die Therapie mit 50µl i.n. der unten beschriebenen Polyplexsuspension („Therapie“). Die lokale Allergenprovokation mit OVA-Aerosol erfolgte an den Tagen 25 bis 27 („Provokation“). Am Tag 28 des Versuchs wurde die Lungenfunktion der Mäuse gemessen; am darauffolgenden Tag geopfert wurden alle weiteren Parameter analysiert („Analyse“).

Zunächst wurden die Mäuse gegen das aus Hühnereiweiß gewonnene Protein Ovalbumin (OVA) sensibilisiert. Dafür wurde jedem Tier zu zwei Zeitpunkten (d0, d14) 10 µg OVA (Grade VI) mit 2,8 mg des Adjuvants Aluminiumhydroxid (Al(OH)₃) in 200 µl PBS gelöst - intra peritoneal (i.p.) appliziert (siehe Abbildung 10). Um eine für das Asthma typische T_H2-bestimmte Entzündung der Atemwege zu erreichen, erfolgte im Anschluss eine lokale Allergenprovokation der Atemwege mit dem OVA-Protein. Dafür wurden die Versuchstiere zu drei Zeitpunkten (d25, d26, d27) in einer Expositions-kammer für 20 Minuten dem Aerosol einer 1%igen OVA-Lösung (OVA Grade V) ausgesetzt. Das Aerosol wurde mittels eines etablierten Aerosol-Generators Pari Master erzeugt.

Material	Bezugsquelle
Balb/c Mäuse	Harlan Winkelmann, Borcheln, D
OVA® Grade VI	Sigma, Taufkirchen, D
Inject Alum (Al(OH) ₃)	Pierce, Rockford, USA
OVA Grade V	Sigma, Taufkirchen, D
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA, LaboratoriesGmbH, Cölbe, D
Acrylkammer (20 x 20 x 15 cm)	KH Zehlendorf, Berlin, D
Pari® Master	Pari, Starnberg, D

2.5.2 Therapie

Für den Tierversuch wurde ein präventives Therapiemodell eingesetzt. Um bereits während der lokalen Allergenprovokation in der Lunge einen Wirkstoffspiegel an DNazym vorzuhalten und von Beginn an eine immunmodulatorische Wirkung zu erzielen, wurden die Tiere bereits 24 Stunden vor der ersten OVA Provokation behandelt.

Alle Versuchstiere erhielten intranasal mit je 50 µl Wirkstoff bzw. Kontrolllösung nach folgendem Schema (alle Bestandteile suspendiert in PBS):

Versuchsgruppe		Menge hgd40 DNAzym	Menge PEI(25kDa)-g-PEG(5kDa) ⁴ Polymer
1	PBS	0 µg	0 µg
2	hgd40	50 µg	0 µg
3	PEI-PEG	0 µg	73 µg (entsprechend 40,3µg PEI(25kDa))
4	N/P 6	50 µg	73 µg (entsprechend 40,3µg PEI(25kDa))
5	N/P 12	50 µg	146,7 (entsprechend 80,6µg PEI(25kDa))
6	N/P 18	50 µg	220 µg (entsprechend 120,9 µg PEI(25kDa))

Eine Therapie mit den oben genannten Wirkstoffkombinationen wurde vier Mal im Abstand von 24 Stunden beginnend am Tag 24 jeweils 3 Stunden vor der lokalen Allergenprovokation (an den Tagen 25-27) .

2.5.3 Messung der Lungenfunktion

Ein wichtiger pathophysiologischer Parameter des Asthmas ist die Bronchokonstriktion, die eine Verringerung des Atemflusses zur Folge hat. Auf eine Reizung der Atemwegsmuskulatur reagieren Asthma Patienten als auch Mäuse im dargestellten Modell mit einer stärkeren Bronchokonstriktion als nicht allergische Kontrollen (Atemwegshyperreagibilität, AHR).

Ein Maß für die Ausprägung AHR im Tiermodell ist die MCh50 Konzentration. Hierbei wird Mäusen inhalativ ein Medikament zur Bronchokonstriktion (Metacholin) verabreicht und in der Lungenfunktion die Konzentration bestimmt, bei der der Atemfluss um 50% reduziert ist.

Die Messung der MCh50 Konzentration erfordert, dass man gleichzeitig die Lungenfunktion *in vivo* messen und Aerosole inhalativ zuführen kann. Daher wurde die Methodik der Head-out Body-Plethysmographie angewendet. Hierbei wird die Maus in

eine Glassröhre positioniert, die auf einer Seite verschlossen ist, und bei der auf der anderen Seite der Kopf der Maus hinausschaut (siehe Abbildung 11 links). Durch eine Manschette um den Hals der Maus wird eine luftdichte Kammer um den Körper der Maus erzeugt. Über Druckänderung in dieser Kammer lassen sich Rückschlüsse auf die Atemfrequenz, die In- und Expirationszeit sowie das Atemzugsvolumen ziehen.

Im Versuch wurde bei vier Mäusen gleichzeitig die Messung der MCh50 durchgeführt. Dafür wurden vier Head-Out Body-Plethysmographen an eine Expositions-kammer angeschlossen (siehe Abbildung 11 rechts). Zunächst wurde für 15 Minuten die Lungenfunktion der Mäuse gemessen, um einen Basiswert zu erhalten. Dann wurden die Mäuse alle 5 Minuten für 70 Sekunden mit einem Metacholin-Aerosol provoziert. Die Konzentration des Metacholins wurde dabei schrittweise erhöht (0 mg/ml, 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml; gelöst in PBS); die Messung wurde beendet, sobald der Atemfluss des jeweiligen Tieres unter 50% des Ausgangswertes fiel.

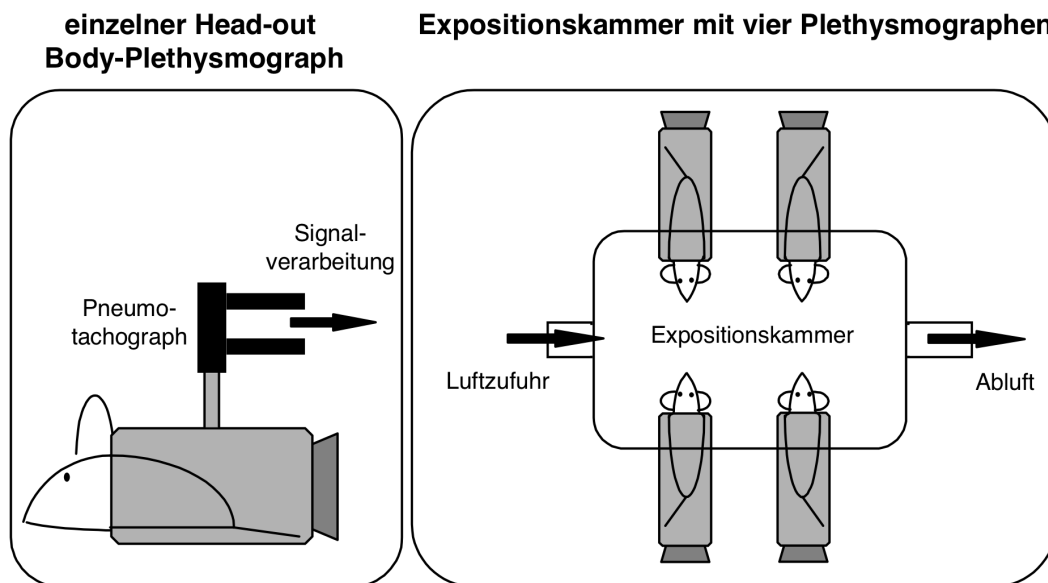


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines Head-out Body-Plethysmographens (nach Dr. M. Wegmann).

Links: Darstellung eines einzelnen Plethysmographen mit Maus; rechts: Versuchsaufbau aus vier an die Expositions-kammer angeschlossene Plethysmographen

Material	Bezugsquelle
Expositionskammer	Crown Glass, Sommerville, USA
Gläserne Plethysmographen	Crown Glass, Sommerville, USA
Dental-Latexmembran (Kofferdam)	Roeko, Langenau, D
Pneumotachographen (PTM 378/1.2)	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D
Differenzdruckwandler (8 T-2)	Galtec, Dunvegan, GB
Potentiometer (S-13)	Galtec, Dunvegan, GB
Oszilloskop (KombiGraf 4)	Gould, Dietzenbach, D
Digital/Analog-Wandelkarte (DAS-16)	Keitley Germering, D
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA, Laboratories GmbH, Cölbe, D
Metacholin	Sigma, Steinheim, D
NOTOCORD hem 3.5 Software	Notocord, Paris, F

2.5.4 Präparation und Probengewinn

Am Präparationstag wurden die Versuchstiere zunächst durch intraperitoneale Gabe von 150 µl Heparin (2500 U/ml) antikoaguliert. Circa 25 Minuten später wurden die Tiere durch überdosierte Narkotika-Gabe i.p. getötet (7,62 mg Ketamin, 0,95 mg Xylazin in 200 µl PBS). Die Axilla wurde präpariert, die axillären Blutgefäße durchtrennt und das Blut in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Nach 60 Minuten wurde das Blut zentrifugiert (30 min, 3000 rpm, 4°C) und das überstehende Serum abgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Thorax und Peritoneum wurden eröffnet. Die Trachea wurde mit einem Skalpell im Cervikalbereich transversal auf einer Länge von ca. 1 mm eingeschnitten. Eine Kanüle wurde an dieser Stelle eingeführt, die Lunge mit 1 ml PBS mit Proteinase-Inhibitor gespült und die so gewonnen Lavage weiter untersucht (2.5.5). Das Herz wurde eröffnet und der Lungenkreislauf über die Pulmonalgefäße mit ca. 5 ml PBS perfundiert. Die nun blutarmen Lungen wurden entnommen und histologisch weiter untersucht.

Material	Bezugsquelle
Heparin-Natrium-5000 (5000 I.E./0,2 ml)	Ratiopharm, Ulm, D
Ketamin Inresa	Inresa, Freiburg, D
Rompun 2% (Xylazin)	Bayer Health Care, Leverkusen, D
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Parschauing, A
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Li-Heparinat Röhrchen (Blutentnahme)	Sarstedt, München, D
Kühlzentrifuge BIOFUGE fresco	Kendro, Langenselbold, D
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, D

2.5.5 Bronchoalveolären Lavage (BAL)

Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) ist eine Möglichkeit, Probenmaterial aus der Lunge zu gewinnen. Im Kontrast zur Histologie, die Aufschlüsse über die Morphologie des Gewebes gibt, erhält man bei der BAL Informationen zur Situation *in* den Atemwegen und Alveolen. Dabei können sowohl die residenten Zellen differenziert, als auch das Zytokinmilieu bestimmt werden. Die gewonnene Lavage wurde bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20° C eingefroren.

Zelldifferenzierung

Analog zu 2.2.3 wurde die Zellzahl des suspendierten Zellpellets im Cell-Counter bestimmt. Nach einem zusätzlichen Verdünnungsschritt wurden die Zellen dann mit einer Zytocentrifuge auf einen Objektträger gebracht und dort getrocknet. Die Färbung der Proben erfolgte mit der kommerziellen erhältlichen Diff-Quick Färbung. Die Analyse erfolgte im Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung. Die Differenzierung der Zelltypen erfolgte nach morphologischen Kriterien in Lymphozyten, Makrophagen, neutrophilen sowie eosinophilen Granulozyten.

Material	Bezugsquelle
Diff-Quick Färbung	Dade Behring, Deerfield, USA
Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig, D

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist es, Erkenntnisse über die Aufnahme von DNAzymen in der Lunge zu erhalten und Wege zu finden, diese Aufnahme zu optimieren. Dazu wurden zwei verschiedene *in vitro* Ansätze bearbeitet, die diese Arbeit in zwei Teile aufgliedert. Im ersten Teil wurde untersucht, ob Surfactant mit der Aufnahme DNAzymen interagiert bzw. deren Aufnahme verbessern kann. Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob sich PEI und PEI-PEG Nanopartikel für die Transfektion von therapeutischen DNAzymen eignen, wobei diese Frage sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bearbeitet wurden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Surfactant-Produkte (Alveofact®, Curosurf®) untersucht. Bei Alveofact® handelt es sich dabei um die Phospholipidfraktion aus Rinderlungen, bei Curosurf® um die aus Schweinelunge extrahierte Phospholipidfraktion. Zur Transfektion wurden zwei verschiedene DNAzyme (hgd40-FAM, gd21-FAM) in drei verschiedenen Zelllinien (A549, BEAS-2B, Jurkat) eingesetzt. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie, die Menge des aufgenommenen DNAzyms wurde über eine Fluoreszenz-Markierung detektiert.

Als zweiter Ansatz wurde im Folgenden untersucht, ob und in welchem Maße sich PEI- und PEI-PEG Nanopartikel für die Transfektion von DNAzymen eignen. Hierbei erfolgte erneut der *in vitro* Versuchsaufbau aus Zellkultur, farbmarkiertem DNAzym (hgd40-FAM) und die Analyse im FACS. Im Hinblick auf den Tierversuch wurden dabei murine Zelllinien eingesetzt LA-4 (murine Alveolarzelllinie), EL-4 (murine T-Zelllinie). Um eine Information über die räumliche Verteilung der PEI/DNAzyme Partikel in der Zelle zu erhalten wurde als ergänzendes Messsystem die konfokale Laser-Mikroskopie eingesetzt. Die *in vitro* gewonnenen Daten wurden dann für einen Tierversuch genutzt, in dem die kombinierte Therapie von DNAzym und PEI-PEG-Polymer *in vivo* getestet wurde.

3.1 Surfactant als Transfektionsmittel *in vitro*

3.1.1 Alveofact® führt nicht zu einer verbesserten Aufnahme

Um zu überprüfen, ob Surfactant eine transfizierende Wirkung hat, wurden je 1,5 µg des hgd40 DNAzyms mit 0,1 µg bis 500 µg gelöstem Alveofact® -Surfactant gemischt und 24 Stunde mit Zellen der A549 Zelllinie inkubiert.

Als Kontrollen dienten die Transfektion der gleichen Menge DNAzym mit DOTAP (positiv) und die Gabe der gleichen Menge DNAzym ohne Transfektionsreagenz (negative) zu den Zellen.

Im Versuch ergaben sich nur marginale Unterschiede zwischen der Aufnahme von DNAzym in den Proben mit Surfactant und der Negativkontrolle ohne Surfactant. Insbesondere konnte kein von der Konzentration des Surfactants abhängiger Unterschied gefunden werden (siehe Abbildung 12). Es zeigte sich aber, dass die eingesetzte Menge von 500 µg Alveofact® in 500 µl Medium kaum löslich war. Aus diesem Grund wurde die maximal eingesetzte Menge Surfactant für die folgenden Versuche beschränkt. DOTAP zeigte bereits eine Autofluoreszenz in der Kontrollprobe, die in den nächsten Versuchen durch eine größere Menge DNAzym und somit einem höher angesetzten Grenzwert zwischen transfiziert und nicht transfiziert kompensiert wurde (vgl. 2.3).

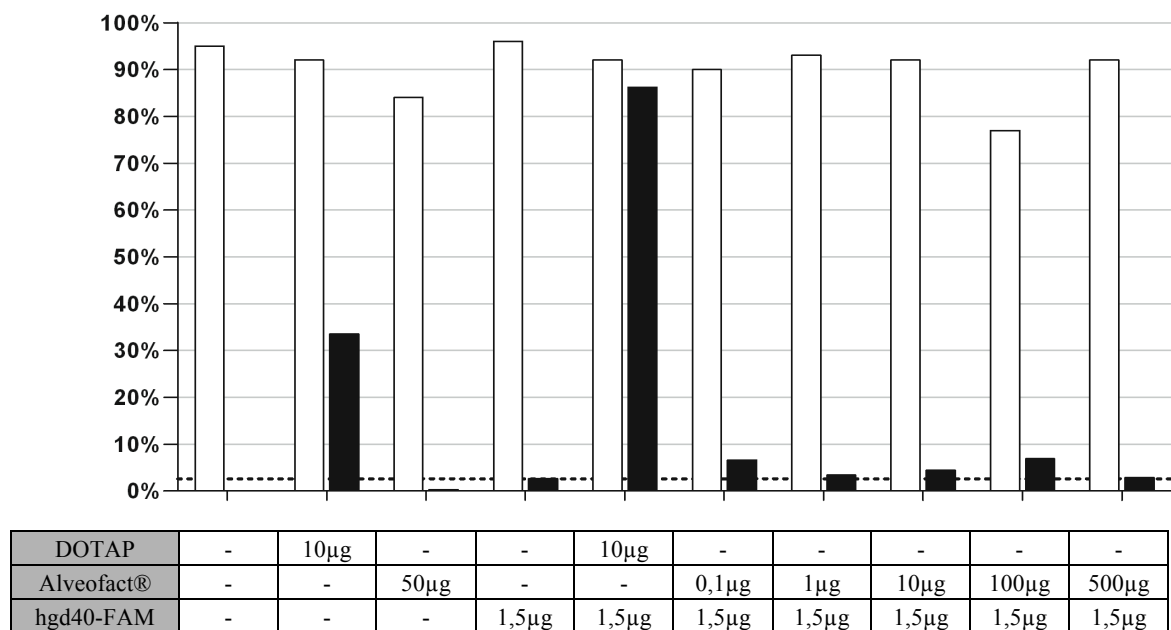


Abbildung 12: Transfektion von A549 Zellen mit Alveofact®-Surfactant

Dargestellt sind in Weiß: Der relative Anteil vitaler Zellen (in Prozent); in Schwarz: der relative Anteil der transfizierten Zellen (in Prozent). Die eingesetzten Stoffmengen sind in der jeweiligen Spalte der Tabelle angegeben. Die gestrichelte Hilfslinie stellt die Negativkontrolle, also das Signal der Transfektion mit „nacktem“ hgd40 dar, mit dem die untersuchten Proben verglichen wurden.

Um weiter zu überprüfen, ob ein möglicher Effekt abhängig von der verwendeten Zelllinie ist, wurden analoge Versuche mit modifizierten Mengen von DNazym und DOTAP an BEAS-2B und Jurkat Zellen durchgeführt (siehe Abbildung 13 und Abbildung 14).

Auch hierbei zeigten sich keine relevanten Unterschiede zwischen der Negativkontrolle (nur hgd40) und der Verwendung von hgd40 zusammen mit Alveofact® Surfactant. Die Konzentration des Surfactants spielte ebenso wie in den vorhergehenden Versuchen keine Rolle. Bemerkenswerterweise war die Anzahl der transfizierten Zellen durch DOTAP bei BEAS-2B Zellen geringer als bei den Jurkat Zellen.

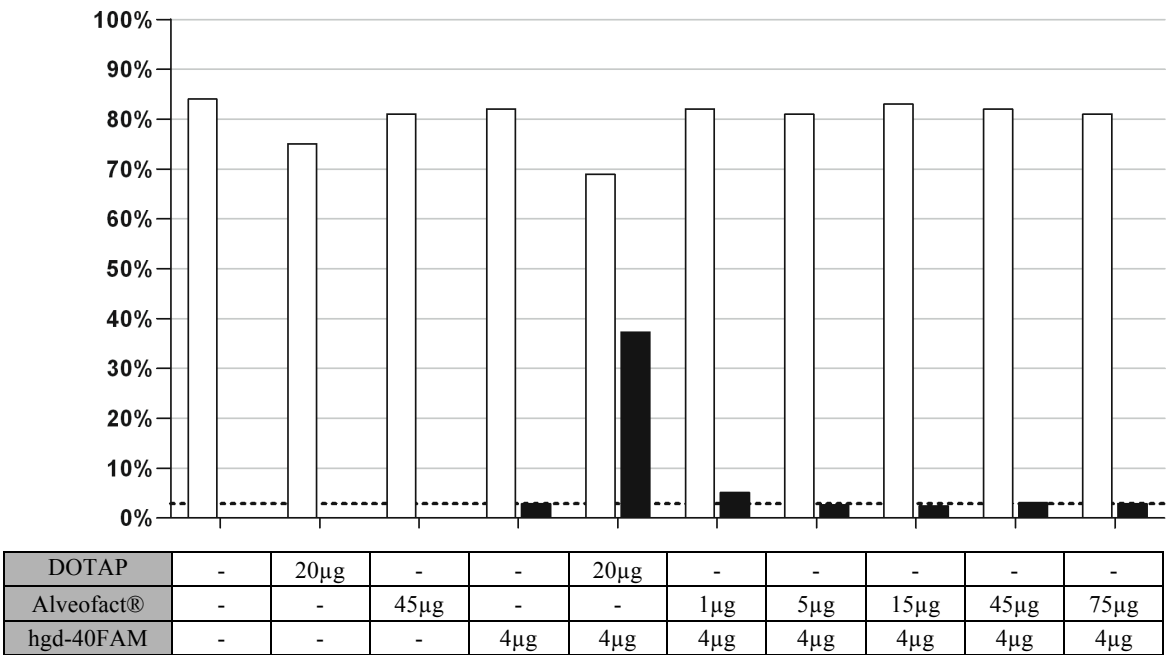


Abbildung 13: Transfektion von BEAS-2B Zellen mit Alveofact®-Surfactant

Dargestellt sind in Weiß: Der relative Anteil vitaler Zellen (in Prozent); in Schwarz: der relative Anteil der transfizierten Zellen (in Prozent). Die eingesetzten Stoffmengen sind in der jeweiligen Spalte der Tabelle angegeben. Die gestrichelte Hilfslinie stellt die Negativkontrolle, also das Signal der Transfektion mit „nacktem“ hgd40 dar, mit dem die untersuchten Proben verglichen wurden.

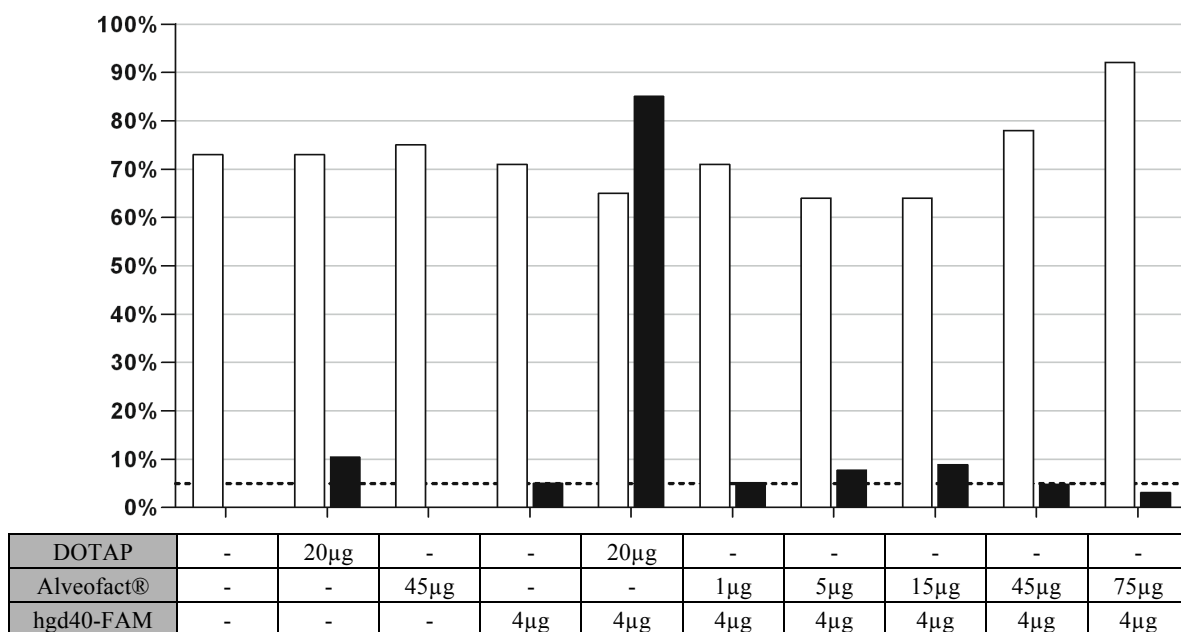
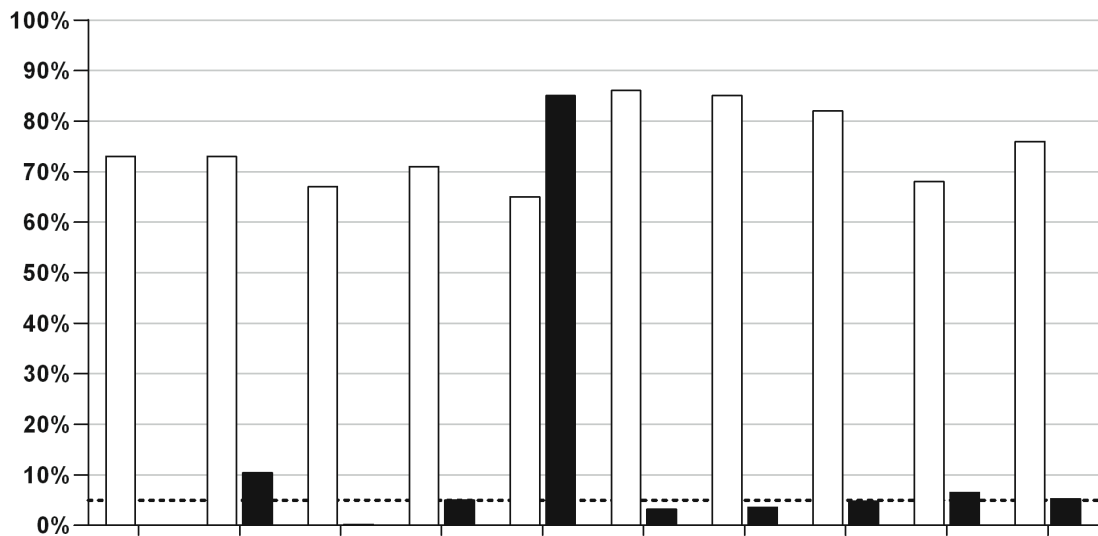


Abbildung 14: Transfektion von Jurkat-Zellen mit Alveofact®-Surfactant

Dargestellt sind in Weiß: Der relative Anteil vitaler Zellen (in Prozent); in Schwarz: der relative Anteil der transfizierten Zellen (in Prozent). Die eingesetzten Stoffmengen sind in der jeweiligen Spalte der Tabelle angegeben. Die gestrichelte Hilfslinie stellt die Negativkontrolle, also das Singal der Transfektion mit „nacktem“ hgd40 dar, mit dem die untersuchten Proben verglichen wurden.

3.1.2 Curosurf® führt nicht zu einer verbesserten Aufnahme

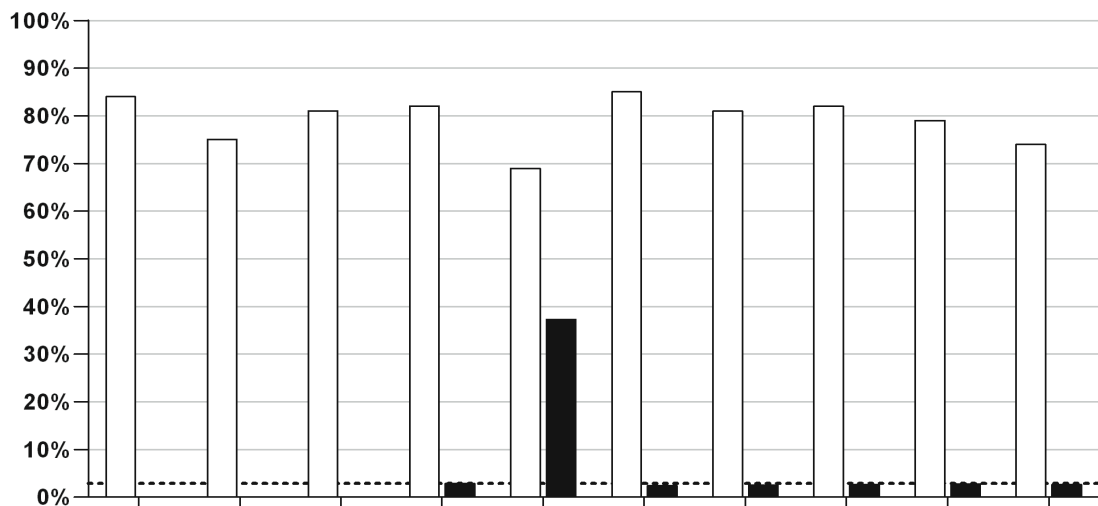
Um zu überprüfen ob, die Aufnahme abhängig von der verwendeten Surfactant-Präparation ist, wurde anstelle des zunächst verwendeten Alveofact® Surfactants die Curosurf®-Präparation untersucht. Der Versuchsaufbau war dabei derselbe wie bei den zuvor beschriebenen Messung an Jurkat und BEAS-2B Zellen unter Einsatz von Alveofact® -Surfactant. Die Messungen der Aufnahme unter Verwendung von Curosurf® zeigten ein analoges Bild zu den Untersuchungen mit Alveofact®. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen Surfactant-Proben und Negativkontrolle (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16).



DOTAP	-	20µg	-	-	20µg	-	-	-	-	-
Curosurf®	-	-	45µg	-	-	1µg	5µg	15µg	45µg	75µg
hgd40-FAM	-	-	-	4µg	4µg	4µg	4µg	4µg	4µg	4µg

Abbildung 15: Transfektion von Jurkat Zellen mit Curosurf®-Surfactant

Dargestellt sind in Weiß: Der relative Anteil vitaler Zellen (in Prozent); in Schwarz: der relative Anteil der transfizierten Zellen (in Prozent). Die eingesetzten Stoffmengen sind in der jeweiligen Spalte der Tabelle angegeben. Die gestrichelte Hilfslinie stellt die Negativkontrolle, also das Signal der Transfektion mit „nacktem“ hgd40 dar, mit dem die untersuchten Proben verglichen wurden.



DOTAP	-	20µg	-	-	20µg	-	-	-	-	-
Curosurf®	-	-	45µg	-	-	1µg	5µg	15µg	45µg	75µg
hgd40-FAM	-	-	-	4µg	4µg	4µg	4µg	4µg	4µg	4µg

Abbildung 16: Transfektion von BEAS-2B Zellen mit Curosurf®-Surfactant

Dargestellt sind in Weiß: Der relative Anteil vitaler Zellen (in Prozent); in Schwarz: der relative Anteil der transfizierten Zellen (in Prozent). Die eingesetzten Stoffmengen sind in der jeweiligen Spalte der Tabelle angegeben. Die gestrichelte Hilfslinie stellt die Negativkontrolle, also das Signal der Transfektion mit „nacktem“ hgd40 dar, mit dem die untersuchten Proben verglichen wurden.

3.1.3 Die Versuchsergebnisse sind unabhängig vom verwendeten DNazym

Um eine Abhängigkeit von dem verwendeten DNazym zu überprüfen, wurde zusätzlich im folgenden Versuch ein weiteres DNazym (gd21-FAM) in Verbindung mit Surfactant Alveofact eingesetzt.

In diesem Versuch zeigten sich keine relevanten Unterschiede in der Transfektionseffizienz zwischen dem hgd40 und dem gd21 DNazym sowohl bei den Kontrollen als auch bei der Verwendung von Alveofact (siehe Abbildung 17).

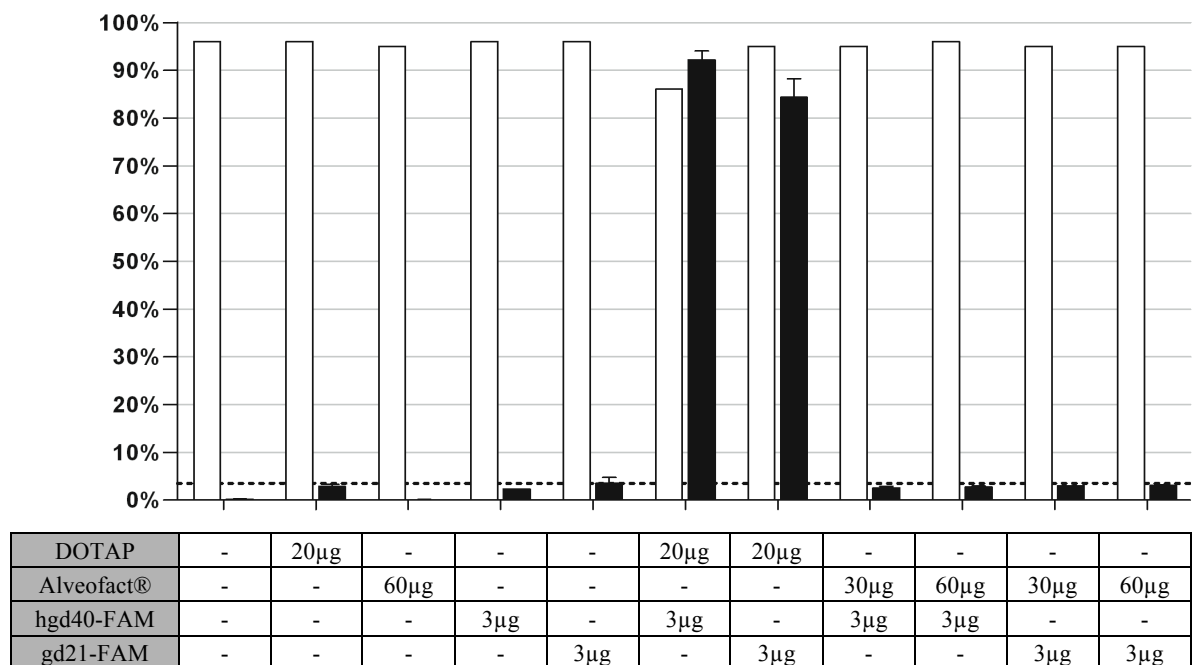


Abbildung 17: Transfektion von A549 Zellen mit Alveofact® -Surfactant

Dargestellt sind in Weiß: Der relative Anteil vitaler Zellen (in Prozent); in Schwarz: der relative Anteil der transfizierten Zellen (in Prozent). Die eingesetzten Stoffmengen sind in der jeweiligen Spalte der Tabelle angegeben. Die gestrichelte Hilfslinie stellt die Negativkontrolle, also das Signal der Transfektion mit „nacktem“ hgd40 dar, mit dem die untersuchten Proben verglichen wurden.

3.2 PEI und PEI-PEG Polyplexe *in vitro*

3.2.1 PEI und PEI-PEG Polymere sind zur Transfektion geeignet

Im zweiten Teil der Arbeit wurden PEI/DNAzym- und PEI-PEG/DNAzym- Komplexe auf ihre Transfektionseigenschaften hin untersucht. Dafür wurde zunächst eine fixe Menge DNAzym mit DOTAP, PEI und einem PEI-PEG Polymer komplexiert und die Zellkulturlinien mit dem entstandenen Lipoplex/Polyplex transfiziert.

Im initialen Versuch wurden dabei die im Hinblick auf ein Tierexperiment gewählten murinen LA-4 Zellen mit verzweigt-kettigem PEI (25kDa) und PEI(25kDa)-g-PEG(2kDa)10 transfiziert (siehe Abbildung 18). Als Positivkontrolle diente, wie auch schon in den Untersuchungen zu Surfactant, das Liposom DOTAP. Im Versuch wurden sowohl mit PEI/DNAzym als auch mit PEI-PEG/DNAzym-Komplexen gute Transfektionsraten erreicht. Diese lagen mit einem Anteil transfizierter Zellen von mehr als 80% im Bereich der DOTAP Transfektionen.

Auffällig war allerdings auch, dass bei der Transfektion mit den PEI-Polyplexen eine deutliche Reduktion der vitalen Zellen festgestellt wurde.

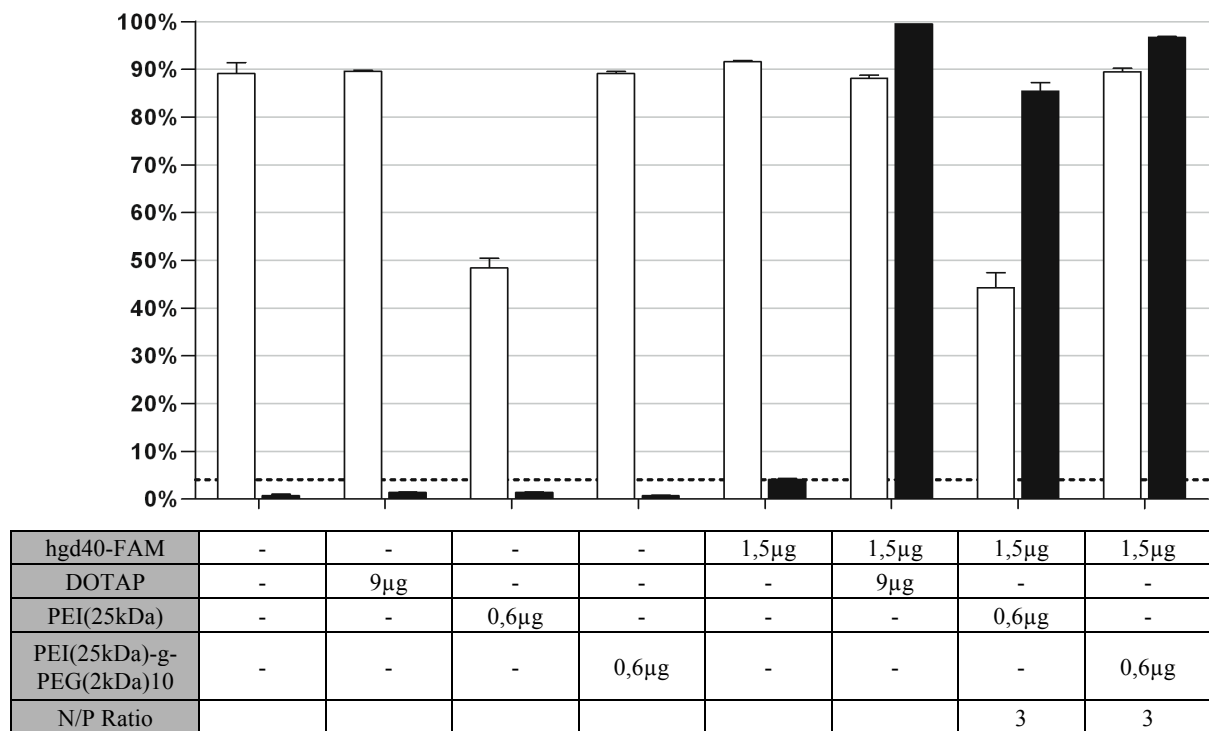


Abbildung 18: Vergleich der Transfektion von PEI(25kDa) und PEI(25kDa)-g-PEG(2kDa)10
 Dargestellt sind in Weiß: Der relative Anteil vitaler Zellen (in Prozent); in Schwarz: der relative Anteil der transfizierten Zellen (in Prozent). Die eingesetzten Stoffmengen sind in der jeweiligen Spalte der Tabelle angegeben. Die gestrichelte Hilfslinie stellt die Negativkontrolle, also das Signal der Transfektion mit „nacktem“ hgd40 dar, mit dem die untersuchten Proben verglichen wurden.

3.2.2 Die Transfektionseffizienz ist konzentrationsabhängig

Als Vorversuch für die weiteren Experimente wurde untersucht, in welchen Konzentrationen die Polyplexe vorliegen müssen um eine suffiziente Transfektion zu erreichen. Die durchgeführte Verdünnungsreihe ist in Abbildung 19 dargestellt. Die eingesetzte Menge Polyplex in 500 µl Volumen lag zwischen 3 µg und 0,01 µg DNAzym bei einer konstanten N/P-Ratio von 3.

Es zeigte sich, dass die Transfektionseffizienz konzentrationsabhängig ist. Bei der maximal eingesetzten Menge von 3 µg DNAzym bei einer N/P-Ratio von 3 wurden mehr als 95% der Zellen transfiziert. Bis zu einer 64-fachen Verdünnung des Polyplexes auf 0,19 µg DNAzym war eine deutlich verbesserte Aufnahme, verglichen mit der Gabe von 3 µg „nacktem“ DNAzym, nachweisbar.

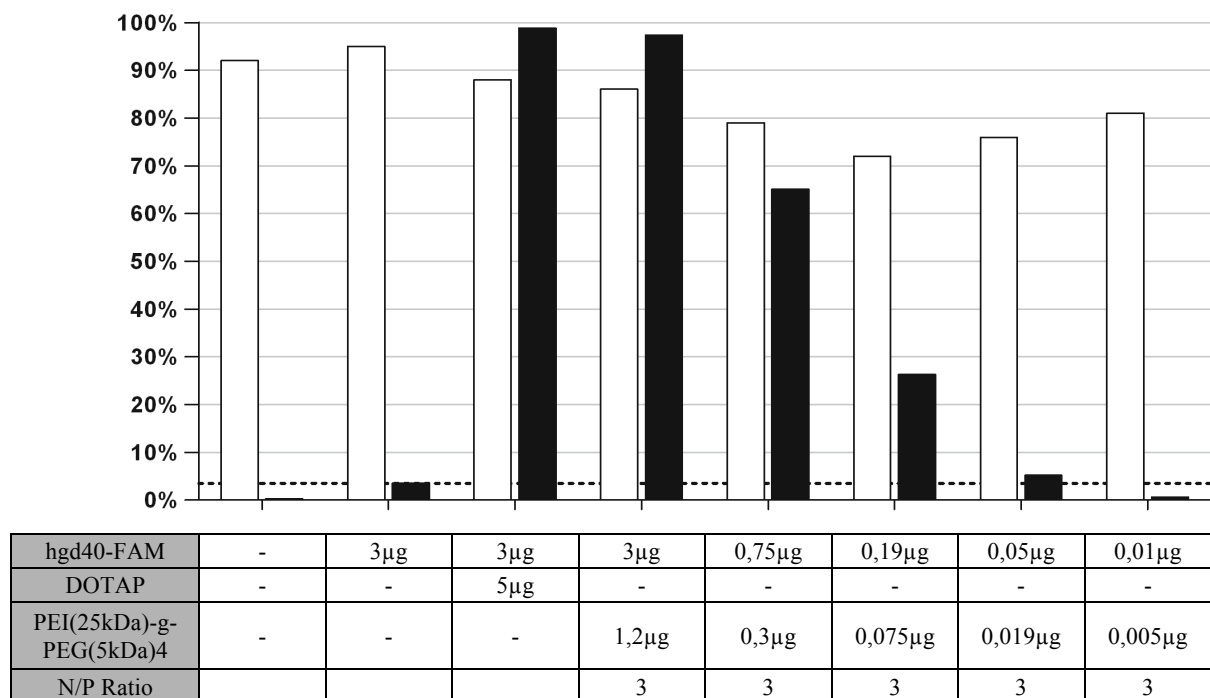


Abbildung 19: Transfektion von LA-4 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen PEI

Dargestellt sind in Weiß: Der relative Anteil vitaler Zellen (in Prozent); in Schwarz: der relative Anteil der transfizierten Zellen (in Prozent). Die eingesetzten Stoffmengen sind in der jeweiligen Spalte der Tabelle angegeben. Die gestrichelte Hilfslinie stellt die Negativkontrolle, also die Transfektion mit „nacktem“ hgd40 dar, mit dem die untersuchten Proben verglichen wurden.

3.2.3 PEG-Seitenketten beeinflussen die Transfektionseffizienz

Um den Einfluss der PEG-Seitenketten auf die Transfektionseffizienz der PEI-PEG/DNAzym Polyplexe zu untersuchen, wurden die unterschiedlichen PEI-PEG Polymere in gleichem N/P-Verhältnis und gleicher DNAzym Menge komplexiert und für die Transfektion eingesetzt. Abbildung 20 zeigt die Transfektion von EL-4 (a und c) sowie LA-4 Zellen (b und d) mit hoher (a und b; 6µg DNAzym N/P 3) und niedriger (c und d; 0,75 µg DNAzym N/P 3) Polyplexkonzentration.

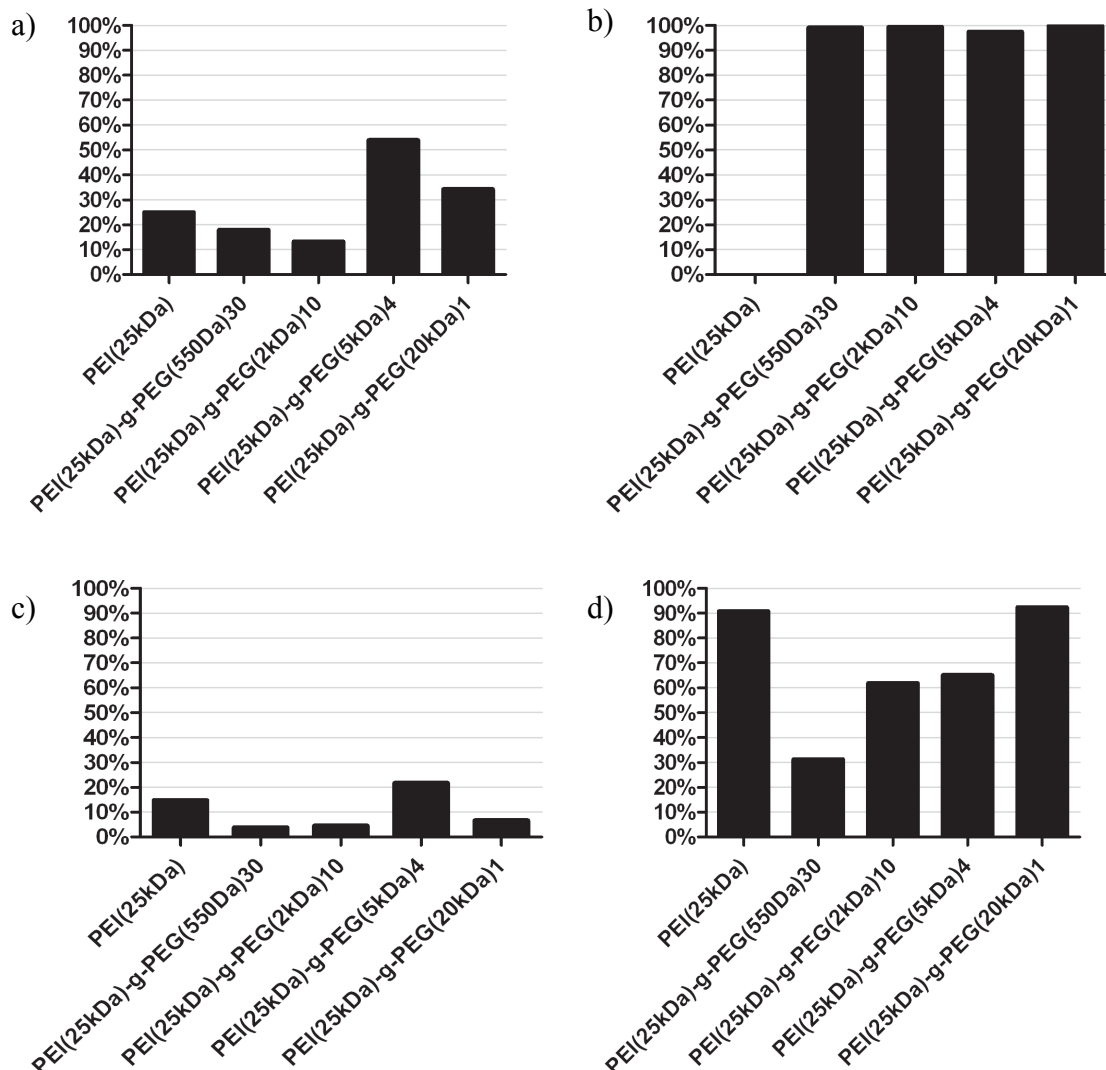


Abbildung 20: Transfektion von EL-4 Zellen mit unterschiedlichen Polymeren

Dargestellt ist der Anteil der jeweils transfizierten Zellen in Prozent. In a) und c) wurden EL-4 Zellen, in b) und d) LA-4 Zellen eingesetzt. Die Polyplex-Menge lag bei a) und b) bei 6 µg DNAzym und N/P-3, bei c) und d) bei 0,75 µg DNAzym und N/P-3.

Die EL-4-Zellen konnten am besten mit PEI(25kDa)-g-PEG(5kDa)4 transfiziert werden, PEI(25kDa)-g-PEG(20kDa)1 führte zu einer ca. 20% geringeren

Transfektionsraten, die anderen PEI-PEG Polymere erzielten deutlich geringere Transfektionsraten. Bei der Transfektion der LA-4 Zellen mit hoher Konzentration starben unter PEI ein Großteil der Zellen und wurden daher nicht analysiert. Mit allen anderen Polyplexen wurden Transfektionsraten größer 95% erreicht. Bei niedriger Konzentration war unter den PEI-PEG Polymeren bei PEI(25kDa)-g-PEG(20kDa)1 die größte Aufnahme zu verzeichnen, gefolgt von PEI(25kDa)-g-PEG(5kDa)4 und PEI(25kDa)-g-PEG(2kDa)10.

3.2.4 Die Transfektionseffizienz ist abhängig vom N/P Verhältnis

Es ist bekannt, dass Polyplexe mit unterschiedlichen Verhältnissen zwischen RNA und PEI bzw. DNA und PEI unterschiedliche Eigenschaften aufweisen.

Daher wurde untersucht, wie sich unterschiedliche PEI/DNAzym-Verhältnisse (N/P-Ratio) auf die Transfektion auswirken. Es wurden N/P-Verhältnisse zwischen 1 und 10 eingesetzt. Die Menge an verwendetem DNAzym war in allen Proben gleich.

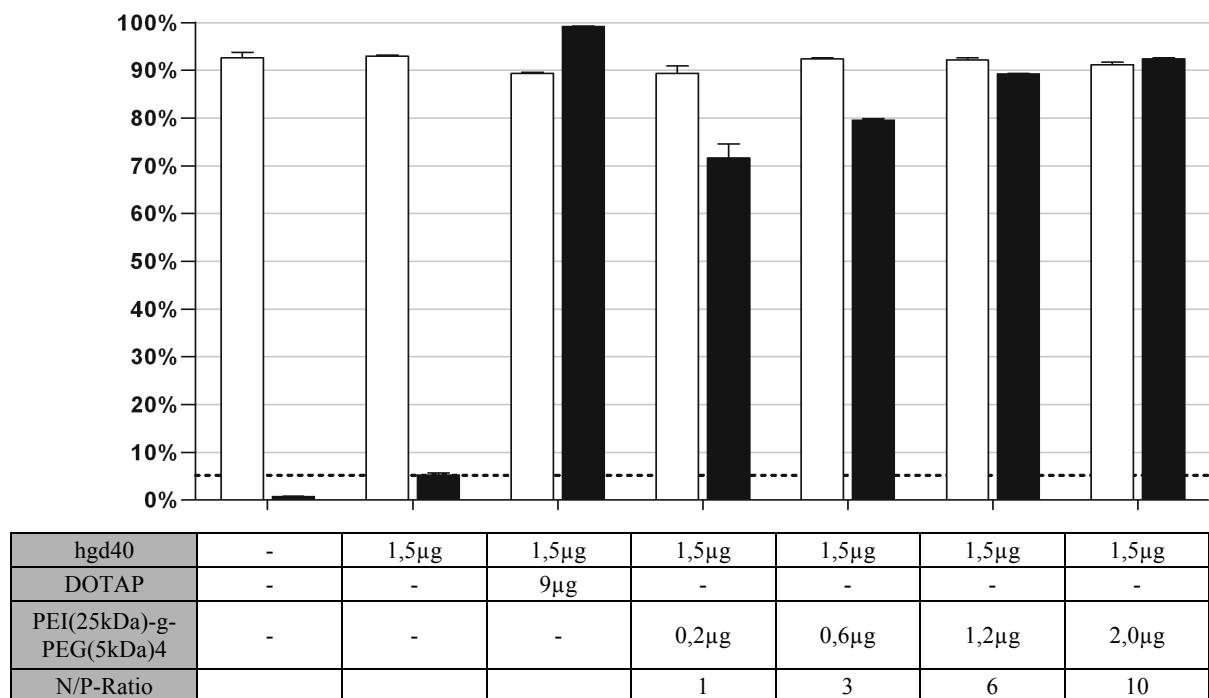


Abbildung 21: Transfektion von LA-4 Zellen unter Verwendung unterschiedlicher N/P-Ratios

Dargestellt sind in Weiß: Der relative Anteil vitaler Zellen (in Prozent); In Schwarz: der relative Anteil der transfizierten Zellen (in Prozent). Die eingesetzten Stoffmengen sind in der jeweiligen Spalte der Tabelle angegeben. Die gestrichelte Hilfslinie stellt die Kontrolle der Transfektion mit „nacktem“ hgd40 dar, mit dem die untersuchten Proben verglichen wurden.

In der Auswertung des Versuchs zeigte sich eine positive Korrelation zwischen N/P-Ratio und dem Anteil transfizierter Zellen. Mit höherem N/P-Verhältnis konnten

zunehmende Mengen an Zellen bei gleicher Menge an DNAzym transfiziert werden (siehe Abbildung 21). Deutlicher trat dieser Effekt noch bei der Betrachtung der durchschnittlichen Fluoreszenz-Intensität der transfizierten Zellen hervor, als Maß für die durchschnittlich aufgenommene Menge an DNAzym pro Zelle (siehe Abbildung 22).

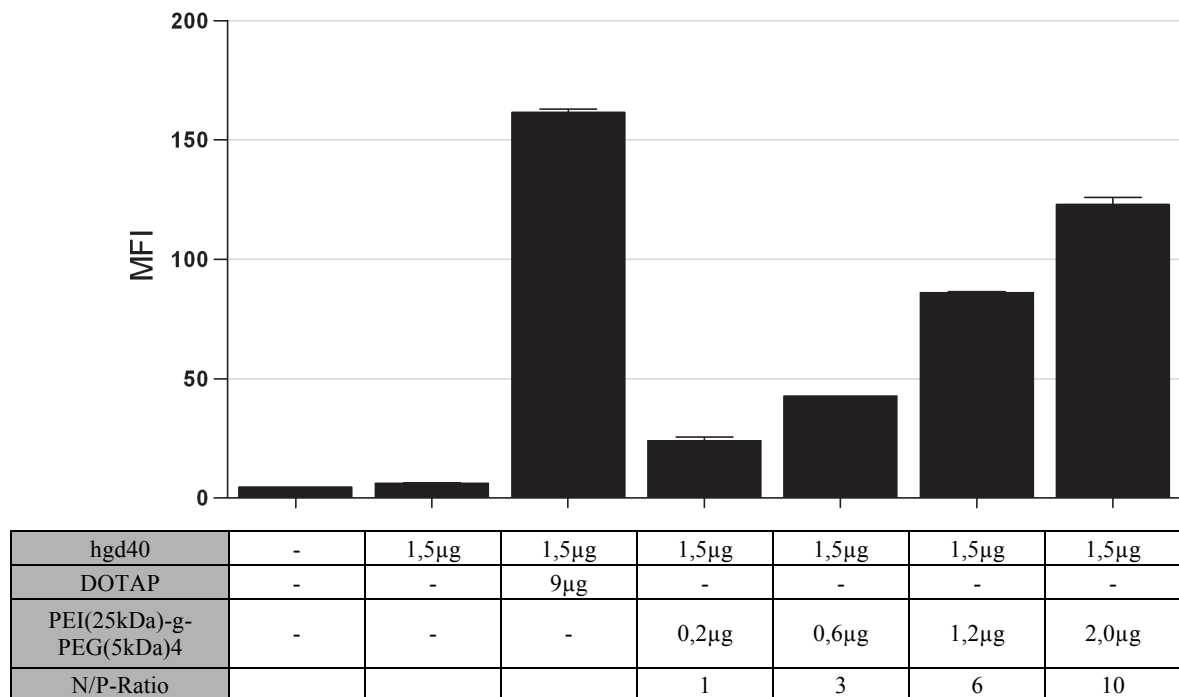


Abbildung 22: Transfektion von LA-4 Zellen unter Verwendung unterschiedlicher N/P-Ratios

Dargestellt ist die durchschnittliche Fluoreszenz einzelner Zellen nach Transfektion, als Maß für die durchschnittlich aufgenommene Menge hgd40-FAM. Die Zusammensetzung der einzelnen Proben ist in der Tabelle unterhalb des jeweiligen Balken angegeben.

So konnte von N/P 1 zu N/P 10 eine deutliche Zunahme der durchschnittlich aufgenommenen Anzahl der DNAzym-Moleküle festgestellt werden. Bei N/P 6 und N/P 10 war der Anteil der transfizierten Zellen ungefähr gleich. Die Menge der aufgenommenen DNAzym-Moleküle lag bei N/P 10 deutlich höher als bei N/P 6.

3.2.5 PEI-PEG Polyplexe werden in die Zelle aufgenommen

Als zweites Messinstrument zur Untersuchung der Aufnahme der DNAzyme wurde neben dem FACS die Konfokalmikroskopie eingesetzt (vgl. 2.4). Ziel der Messung war nicht, ein zweites Werkzeug zum quantitativen Vergleich unterschiedlicher Transfektionsmittel zu haben, sondern die FACS-Messungen auf ihre Sinnhaftigkeit zu überprüfen und die Aufnahme der DNAzyme zu kontrollieren. Im Versuch wurden dazu LA-4 Zellen mit einem PEI(25kDa)-g-PEG(5kDa)4/hgd40-FAM Polyplex transfiziert und fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt.

Die Transfektion mit dem PEI(25kDa)-g-PEG(5kDa)4/hgd40-FAM-Polyplex führte zu einem messbaren Ergebnis. In der in d) dargestellten Probe sind die in grün markierten DNAzyme gut zu sehen, die hier in Aggregaten vorliegen. Durch die Überlagerung des durchlichtmikroskopischen Bildes ist zu erkennen, dass diese Aggregate innerhalb der Zellgrenzen liegen. Bei noch höheren Konzentrationen (e) kommt es zu einer diffusen Anfärbung des Zytoplasmas und Ansammlung im Zellkern (Aufnahme f, dargestellt ohne Überlagerung der DAPI Messung).

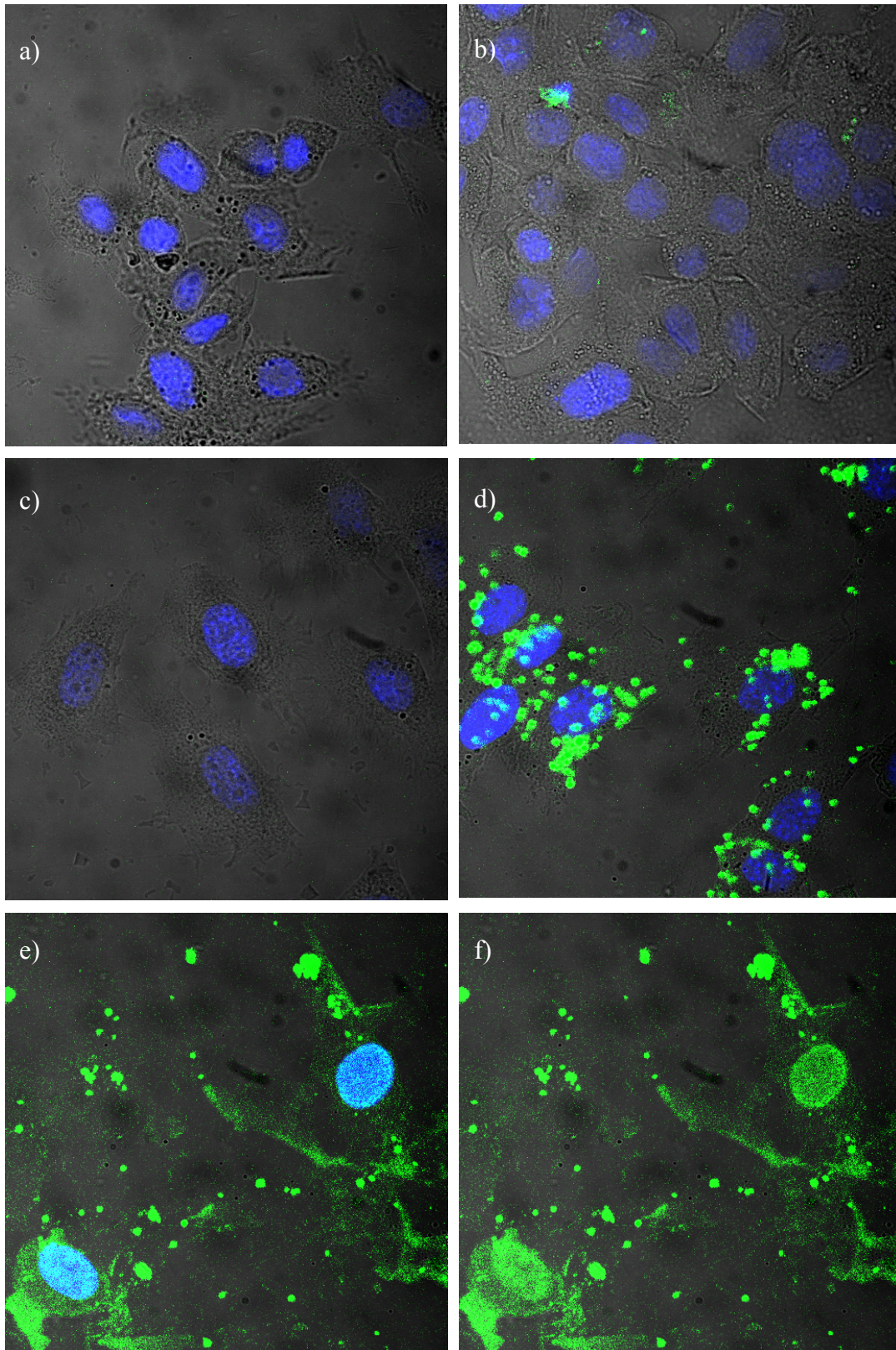


Abbildung 23: Analyse der Transfektion von LA4 Zellen im Konfokalmikroskop

Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen von LA-4 Zellen. In Grün: das farbmakrierte hgd40-FAM DNAzym; in Blau: mit DAPI gefärbte Zellkerne. Die Zellen wurden 24h inkubiert mit: a) ohne hgd40 und ohne Polymer; b) nur mit hgd40-FAM; c) nur mit PEI(25kDa)-g-PEG(5kDa)4; d) mit einem hgd40-FAM (3µg)/PEI(25kDa)-g-PEG(5kDa)4 (4µg) Polyplex; e) und f) mit einem hgd40-FAM (6µg)/PEI(25kDa)-g-PEG(5kDa)4 (8µg) Polyplex; in f) ist die DAPI Färbung ausgeblendet.

3.2.6 Lokalisation von Polyplexen in lysosomalen Strukturen

Um die in 3.2.5 beschriebenen hgd40-Aggregate näher zu differenzieren, wurde unter dem Verdacht, dass es sich um Polyplexe in lysosomalen Vesikeln handelt, ein Lysosomen-spezifischer Farbstoff (Lysotracker) eingesetzt (siehe Abbildung 24).

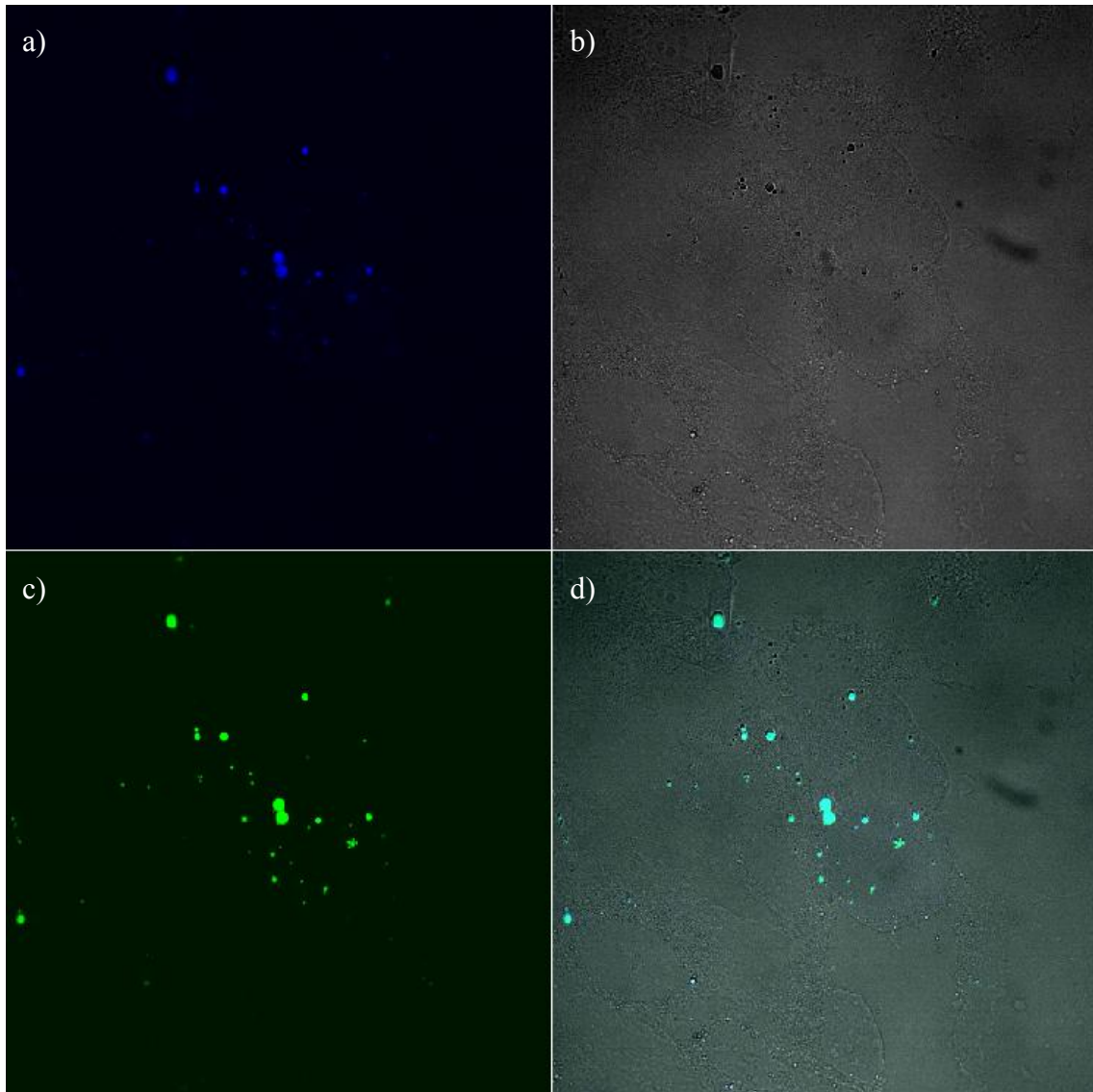


Abbildung 24: Färbung der Lysosomen nach Transfektion von A549 Zellen

Gezeigt ist eine konfokalmikroskopische Aufnahmen von A549 Zellen die mit einem hgd40-FAM (3µg)/PEI(25kDa)-g-PEG(5kDa)4 (4µg) Polyplex transfiziert wurden. a) in Blau dargestellt: die mit Lysotracker blue gefärbten Lysosomalen Vesikel; b) die durchlichtmikroskopische Aufnahme der Zellen; c) in Grün dargestellt: das FAM-markierte hgd40; d) eine Überlagerung der Aufnahmen a), b) und c)

Bei den dargestellten Abbildungen handelt es sich um unterschiedliche Aufnahmen einer mit einem PEI(25kDa)-g-PEG(5kDa)4/hgd40-FAM Polyplex transfizierten Zelle. In a) sind die mit dem Lysotracker angefärbten Lysosomen dargestellt (in blau, DAPI-Kanal), in c) die Aggregate der DNase (in grün, FITC-Kanal). In d) sind a) und c)

sowie die Durchlichtaufnahme b) überlagert. Es ist dabei erkennbar, dass sich das DNAzym und die durch LysoTracker markierten Struktur und somit in lysosomalen Vesikeln befindet.

3.2.7 Die Polymere bilden kondensierte Komplexe

Für die Transfektion wichtige Parameter für Polyplexe sind ihre Größe und ihr Zeta-Potential (vgl. 1.6). Daher wurden auch im Hinblick auf den Tierversuch (vgl. 2.5) diese Parameter für PEI(25kDa)-g-PEG(5kDa)4/hgd40-Polyplex in drei verschiedenen N/P-Verhältnissen bestimmt (vgl. 2.1.2). DNAzym und Polymer formten dabei kondensierte Komplexe mit einem Durchmesser zwischen 82 nm (N/P 12) und 119 nm (N/P 18) (siehe Abbildung 25).

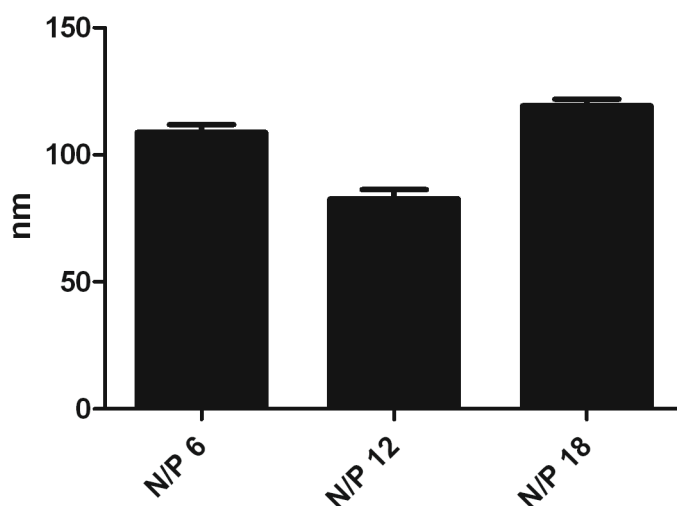


Abbildung 25: Messung der Polyplex-Größe

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der durchschnittlichen Partikelgröße (in nm) des PEI(25kDa)-g-PEG(5kDa)4/hgd40-Polyplex aus drei Messungen

Das Zeta-Potential betrug bei den Polyplexen mit N/P 6 ca. 6 mV bei N/P 12 und N/P 18 ca. 12 mV (siehe Abbildung 26).

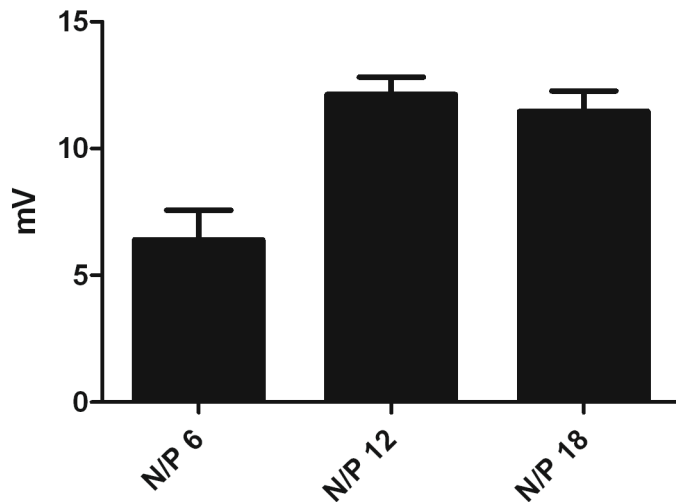


Abbildung 26: Messung Zeta-Potentials

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung des Zeta-Potential (in mV) des PEI(25kDa)-g-PEG(5kDa)4/hgd40-Polyplex aus drei Messung

3.3 PEI-PEG Polyplexe *in vivo*

Basierend auf den vorher beschriebenen Ergebnissen wurde beschlossen, die Wirkung von PEI(25kDa)-g-PEG(5kDa)4 Polymeren in einem initialen Experiment *in vivo* zu untersuchen. In dem unter 2.5 beschriebenen Versuch wurde eine fixe Menge DNAzym sowohl unkomplexiert (Gruppe hgd40), oder mit verschiedenen Mengen Polymer komplexiert (N/P 6, N/P 12, N/P 18) und appliziert. Eine zusätzliche Gruppe (OVA ohne Behandlung) war für den Tierversuche geplant, wurde aber aufgrund technischer Probleme nicht umgesetzt. Die Applikation der Therapeutika erfolgte jeweils einmal täglich an vier aufeinanderfolgenden Tagen. An drei dieser Tage erfolgte jeweils eine Antigen-Restimulation mit OVA-Aerosol (vgl. Abbildung 10).

Unter dieser Therapie verstarben 13 der insgesamt 48 Versuchstiere. Die Verteilung nach Gruppen ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Zwei Mäuse verstarben ohne Zusammenhang zum therapeutischen Versuch (Verletzung am Auge mit konsekutiver Euthanasie nach Body-Plethysmographie; unklare Todesursache eine Woche nach i.p. Immunisierung)

Tabelle 1: Gruppenverteilung der im Tierversuch verstorbenen Mäuse

	PBS	hgd40	PEI-PEG	N/P 6	N/P 12	N/P 18
Analysiert	8	6	1	8	8	2
Tod unter Therapie	0	0	7	0	0	6
Anderweitig verstorben	0	2	0	0	0	0

3.3.1 Atemwegswiderstand

Die Messung der MCh50-Konzentration als Maß für die Überempfindlichkeit der Atemwege ist unter 2.5.3 (Messung der Lungenfunktion) beschrieben.

Von einer Untersuchung der beiden verbleibenden Mäuse aus Gruppe NP 18 wurde abgesehen, da von ihrem klinischen Erscheinungsbild davon auszugehen war, dass sie eine Messung mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht überlebt hätten.

Die Messdaten der MCh50 sind in Abbildung 27 zusammengefasst.

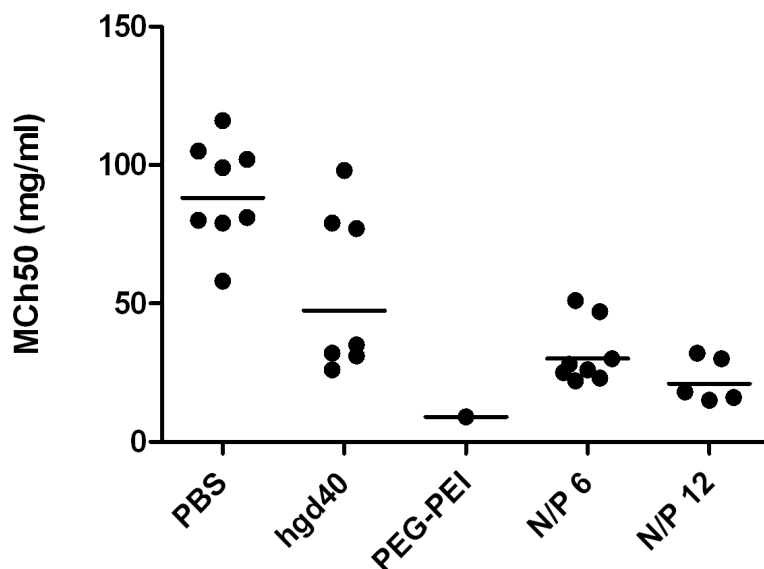


Abbildung 27: Messung der MCh50-Konzentration als Maß der AHR

Dargestellt ist als Punkt der jeweilige Messwert der MCh50 Konzentration pro Tier und die daraus resultierende Mch50 Durchschnittskonzentration pro Versuchsgruppe (als Balken). Zu beachten sind die unterschiedlichen Gruppengrößen: In Gruppe „PBS“ und „N/P 6“ wurden 8 Tiere untersucht. In Gruppe „hgd40“ nur 7 Tiere (wovon ein Tier nach Messung verstarb). Der klinische Zustand der Mäuse erlaubte nur bei 5 Tieren aus Gruppe „N/P 12“ und keinem Tier aus Gruppe „N/P 18“ das durchführen der Untersuchung.

Die PBS-Gruppe, die auch nicht allergisch sensibilisiert worden war, zeigte die geringste Reaktivität gegenüber Metacholin. Geringer war die Toleranz der allergisch

sensibilisierten mit „nacktem“ DNazym therapierten hgd40-Gruppe. Alle mit Polymer therapierten Gruppen zeigten eine geringere MCh50-Schwelle als die hgd40-Gruppe. Die einzige verbliebene Maus aus der Gruppe des unkomplexierten Polymers schnitt am schlechtesten ab.

3.3.2 Veränderungen der Bronchoalveolären Lavage

Die BAL (vgl. 2.5.5) wurde hinsichtlich ihrer Zellularität mittels automatisierter Zellzählung (2.2.3) analysiert und die Zellen mikroskopisch identifiziert. Die Gesamtzellzahl ist in Abbildung 28 dargestellt.

Die Gesamtmenge der Zellen war dabei in der „unbehandelten“ PBS-Gruppe am niedrigsten. In der hgd40-Gruppe wurden minimal mehr Zellen gefunden. Die Zellmenge war signifikant erhöht in den mit PEI(25kDa)-g-PEG(5kDa)₄ therapierten Mäusen. Mit zunehmendem N/P-Verhältnis konnte eine Zunahme der Zellzahl beobachtet werden. Zu beachten ist, dass in der Gruppe des unkomplexierten Polymers (PEI-PEG) und der N/P18-Gruppe auf Grund der hohen Verluste unter Therapie nur zwei bzw. eine Maus analysiert werden konnten.

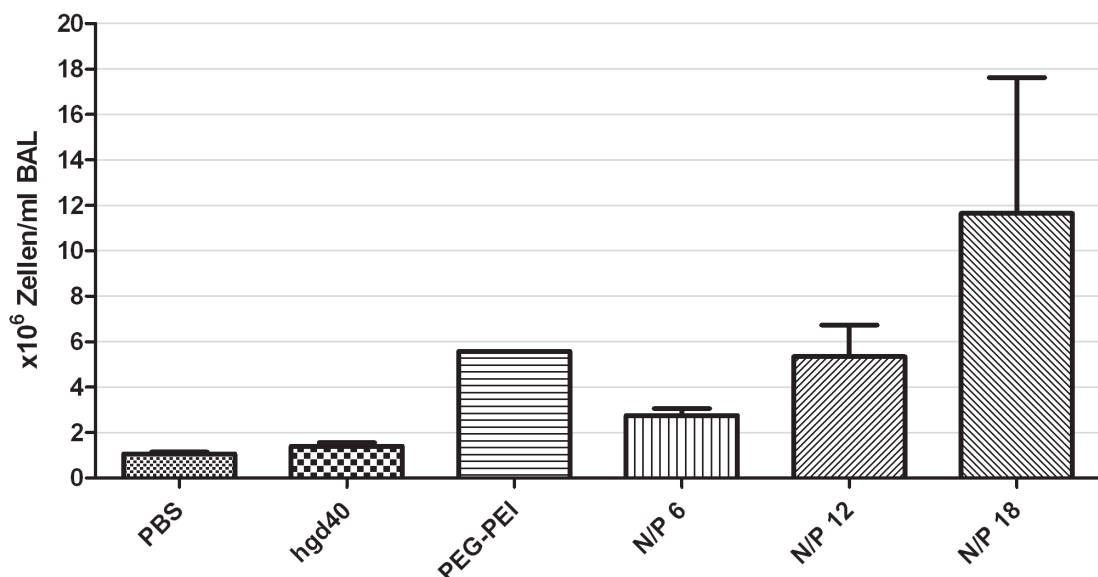


Abbildung 28: Gesamtzellzahl in der BAL

In der Abbildung zu sehen ist der Mittelwert der Zellzahl pro ml BAL in Millionen Zellen (und die zugehörige Standardabweichung).

Die gewonnenen Zellen wurden weiter mikroskopisch analysiert. Die Zusammenfassung der Differenzierung in Makrophagen, Lymphozyten sowie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten ist in Abbildung 29 gegeben. Die Angabe ist dabei relativ, somit ist die Anzahl der Zellen pro 100 Zellen angegeben.

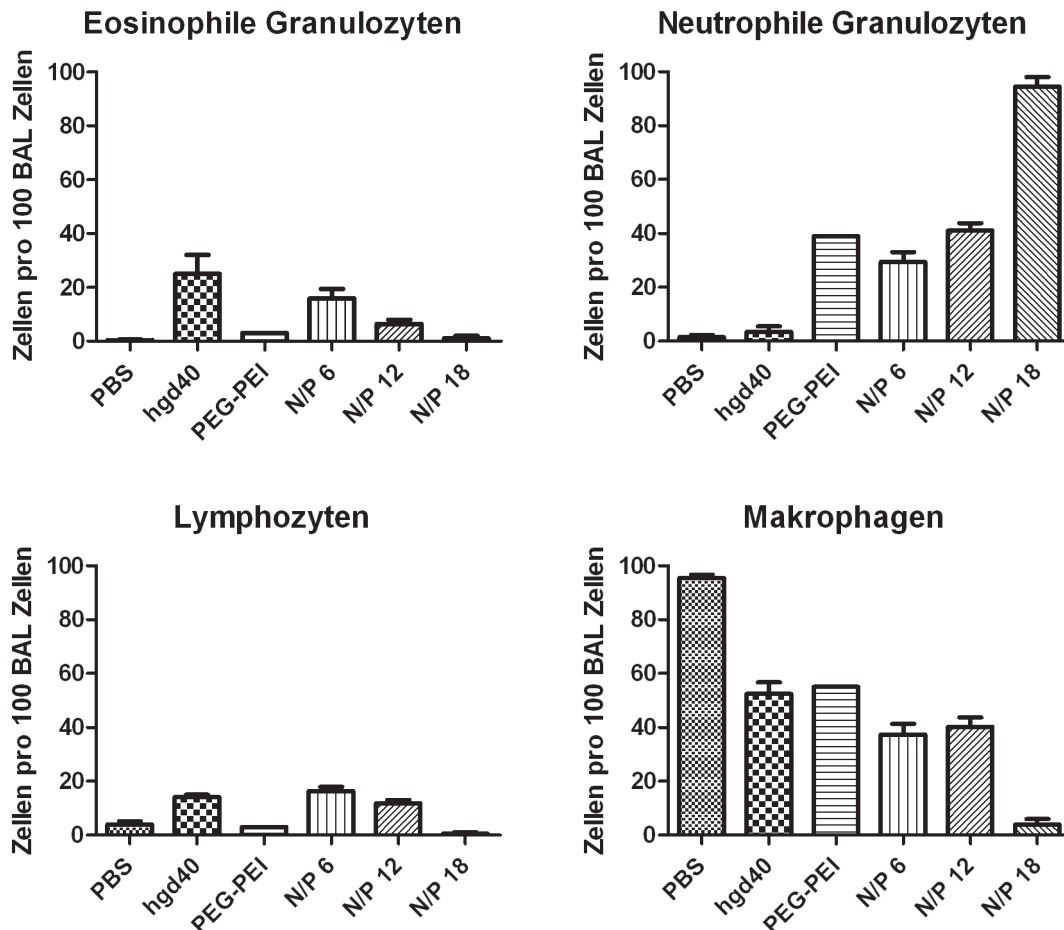


Abbildung 29: Zelldifferenzierung der BAL

In der Abbildung zu sehen ist die relative Anteil von Eosinophilen Granulozyten, Neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen pro 100 Zellen der BAL.

Bemerkenswert sind besonders die Verhältnisse von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten. Eosinophile Granulozyten, die in der nicht sensibilisierten Gruppe (PBS) nicht vorkommen, machen in der allergisch sensibilisierten Gruppe hgd40 ca. 25% der Zellen aus. In den ebenfalls allergisch sensibilisierten Gruppen mit Polymer (PEI-PEG, N/P 6, N/P 12, N/P 18) ist der Anteil der Eosinophilen höher als in der PBS-Gruppe, aber geringer als in der hgd40-Gruppe. Jedoch ist der Anteil neutrophiler Granulozyten in diesen Gruppen deutlich vermehrt. Die neutrophilen Granulozyten zeigen relativ gesehen (Abbildung 29 b) aber besonders auch absolut (Abbildung 30) eine positive

Korrelation mit dem N/P-Verhältnis. In der PBS-Gruppe und der allergisch sensibilisierten hgd40 nur im geringen Maße vorhanden ($>5\%$), steigt ihr Anteil auf ca. 35% bei N/P 6 bzw. ca. 40% bei N/P 12. Bei N/P 18 machen sie mehr als 95% der Zellen aus. Ein gleiches Bild zeigt sich auch in der absoluten Betrachtung (Abbildung 30): Hier steigt die Menge der Neutrophilen von $0,04 \times 10^6$ (hgd40) auf $0,82 \times 10^6$ (N/P 6), $2,19 \times 10^6$ (N/P 12) und $11,21 \times 10^6$ (N/P 18). Vergleichend mit Abbildung 28 zeigt sich, dass der Hauptanteil an der Gesamt BAL Zellen in dieser Gruppe aus neutrophilen Granulozyten besteht.

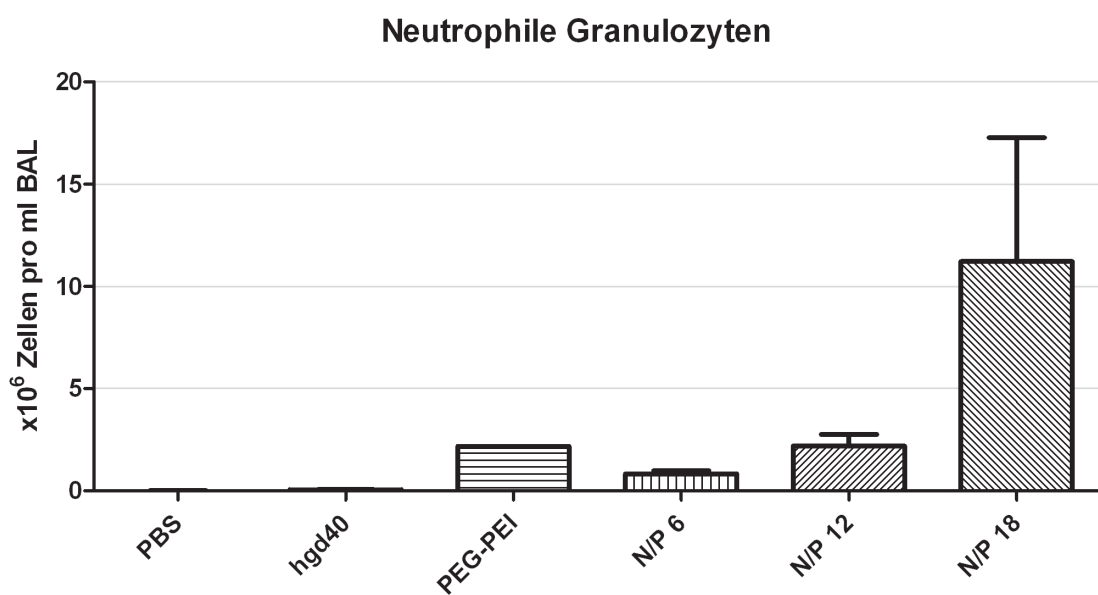


Abbildung 30: Absolute Menge Neutrophiler Granulozyten in der BAL

In der Abbildung zu sehen ist der durchschnittliche absolute Zellzahl Neutrophiler Granulozyten pro ml BAL in Millionen Zellen (und die zugehörige Standardabweichung).

4 Diskussion

4.1 Surfactant und die Aufnahme von DNAzymen

Für die Therapie des Asthma bronchiale stellen immunmodulatorische DNAzyme einen möglichen neuen Therapieansatz dar. Die Applikation dieser Wirkstoffe in die Zielzellen der Lunge ist durch einige Hürden erschwert und die Verbesserung der Aufnahme ist daher Ziel aktueller Forschung. Es konnte gezeigt werden, dass DNA- bzw. RNA-basierte Therapeutika (wie DNAzyme oder siRNAs) *in vivo* in der Lunge ohne Einsatz spezieller Vektoren in Zielzellen aufgenommen werden (Weiss, 2002). Als Erklärung hierfür, wurde in mehreren Publikationen die Hypothese vertreten, dass für diesen Effekt möglicherweise Surfactant mit seiner amphiphilen Struktur eine entscheidende Rolle spielt (Leaman et al., 2002; Nyce and Metzger, 1997; Sel et al., 2008). Sel et al. konnten dabei eine Dosis-Wirkungsbeziehung der Surfactant-Präparation Alveofact® mit der Aufnahme von farbmarkierten DNAzymen *in vitro* in Alveolarzelllinien zeigen (Sel et al., 2008). Dem entgegen gingen andere Autoren davon aus, dass Surfactant *in vitro* per se keine transfizierenden Eigenschaften hat (Weiss, 2002) und *in vivo* im Gegenteil sogar ein Hindernis für die Transfektion darstellt (Densmore, 2006).

Um diesen Zusammenhang zu untersuchen wurden, in dieser Arbeit zwei kommerziell erhältliche Surfactant-Präparationen auf mögliche transfizierende Eigenschaften hin untersucht. Zunächst wurde die von Sel et al. (Sel et al., 2008) beschriebene Kombination aus Alveolarzellen der A549-Zelllinie und der bovinen Surfactant-Präparation Alveofact® untersucht. Dafür wurden die Zellen für 24 Stunden mit DNAzym oder mit DNAzym und Surfactant inkubiert. Als Positivkontrolle diente das liposomale Transfektionsmittel DOTAP.

Es zeigte sich eine gute Transfizierbarkeit der Zelllinie mit dem DOTAP/DNAzym Lipoplex. Entgegen der Erwartung zeigte sich jedoch kein Effekt von Alveofact® auf die Aufnahme des DNAzyms. In keiner der untersuchten Surfactant-Proben zeigte sich eine gesteigerte DNAzym-Aufnahme verglichen mit der Negativkontrolle. Der Versuch wurde zur Kontrolle mehrfach wiederholt (nicht dargestellt), wobei sich das Ergebnis jeweils reproduzierte. Um zu untersuchen ob der Ausgang des Experiments abhängig von einem der eingesetzten Reagenzien war, wurde der Versuchsaufbau im Folgenden

jeweils in einer Variablen verändert. So wurden die eingesetzte Zelllinie, die Surfactant-Präparation und das verwendete DNAzym ausgetauscht.

Zuerst wurden dafür andere Zelllinien eingesetzt. Die humanen Lungenepithelzelllinie BEAS-2B zeigte ein ähnliches Bild wie die zuvor untersuchten A549-Zellen. Die Transfektion war mit DOTAP gut möglich, auch wenn bei dieser Zelllinie die Rate der transfizierten Zellen deutlich geringer war. Die Proben, in denen Surfactant eingesetzt wurden, zeigten wiederum keine Unterschiede zur Negativkontrolle. Zusätzliche zu den Lungenepithelzelllinien A549 und BEAS-2B wurden auch T-Zellen der Jurkat- Zelllinie untersucht, bei denen sich ebenfalls keine messbaren positiven Effekte von Alveofact® auf die Transfektion zeigten. Um eine Unabhängigkeit vom verwendeten Surfactant-Produkt zu untersuchen wurde die eingesetzte Surfactant-Präparation ausgetauscht. Anstelle des aus Rinderlungen gewonnenen Alveofact® wurde das aus Schweinelungen hergestellte Curosurf® eingesetzt. Dabei zeigten sich dem Alveofact® entsprechende Ergebnisse. Sowohl die BEAS-2B- als auch Jurkat-Zellen ließen sich erneut gut mit DOTAP transfizieren. Bei allen Surfactant Untersuchungsgruppen trat jedoch kein Ergebnis auf, das sich von der Negativkontrolle unterschied. In einem letzten Versuch wurde das verwendete DNAzym ausgetauscht. Statt dem bis zu diesem Versuch eingesetzten fluoreszenzmarkierten hgd40 wurde ein fluoreszenzmarkierten ebenfalls GATA-3 spezifisches DNAzym, gd21, eingesetzt. Auch hier bestätigte sich das Bild der vorangegangenen Experimente. Es konnte kein messbarer Unterschied in der aufgenommenen Menge der beiden eingesetzten DNAzyme gefunden werden. Mit DOTAP ließen sich die Zellen sowohl mit gd21 als auch mit hgd40 gut transfizieren. Unter der Verwendung von Alveofact® zeigten sich wiederum keine messbaren Transfektionseffekte.

Nach den durchgeführten Versuchen konnte die Hypothese, die eingesetzten Surfactant Präparationen Alveofact® und Curosurf® würden *in vitro* die Aufnahme von DNAzymen in die Zelle fördern, nicht bestätigt werden. Es zeigte sich in keinem der durchgeführten Versuche eine verstärkte Aufnahme von DNAzymen unter Einsatz von Surfactant, insbesondere konnte keine Dosis-Wirkungsbeziehung nachgewiesen werden. Ob Surfactant einen möglichen direkten transfizierenden Effekt *in vitro* hat, wurde von Sel et al. im Zusammenhang mit DNAzymen (Sel et al., 2008) und von Tsan et al. im Zusammenhang mit Plasmid-DNA untersucht (Tsan et al., 1997). Sel et al.

kamen dabei zu dem Ergebnis, dass Surfactant einen positiven Effekt auf die Aufnahme von DNA hat. Tsan et al. konnten hingegen keinen positiven Effekt finden. Die Ergebnisse dieser Dissertation stehen dabei im Kontrast zu den Ergebnissen von Sel et al., da keine positiven Effekt von Surfactant *in vitro* auf die Transfektion mit DNAsen gefunden wurden. Stützend hierfür sind die Ergebnisse von Tsan et al. und im geringen Maße die Ergebnisse einer Arbeit von Ross et al. (Ross et al., 1995): Hier wurde als Vektor Poly-Lysin an Surfactant Protein A gekoppelt, um dadurch eine rezeptorvermittelte Endozytose zu erreichen. *In vitro* zeigte dieses System eine gute Wirksamkeit, allerdings führte die Zugabe von unkonjugiertem SP-A zum Absinken der Transfektion. Dies spricht für die Funktion dieses Vektorsystems, aber gegen einen starken unspezifischen positiven Effekt des Surfactant-Proteins auf die Transfektion. Jedoch ist die Vergleichbarkeit dieser Daten eingeschränkt, da Sel. et al. eine vollständige Surfactant-Präparation einsetzte und von Ross et al. nur die SP-A Fraktion verwendet wurde.

Eine direkte Übertragung dieser *in vitro* Ergebnisse auf einen *in vivo* Zusammenhang ist jedoch nicht möglich. Daher ist eine Antwort auf die in der Literatur diskutierte Frage, ob Surfactant *in vivo* eine Rolle in der Transfizierbarkeit der Lunge mit nackter DNA spielt (Nyce and Metzger, 1997; Sel et al., 2008), mit den Ergebnissen dieser Dissertation nicht zu geben. Die in der Literatur angegebenen Zusammenhänge zwischen Surfactant und der Aufnahmen von DNA bzw. RNA sind komplex und abhängig von der Fragestellung. So liegen verschiedene Studien zu Surfactant und nackter DNA, Surfactant und viralen sowie Surfactant und non-viralen Vektoren vor.

Surfactant und virale Vektoren: Es wird berichtet, dass die synthetische Surfactant-Präparation Exosurf® die Transfektion mit viralen Vektoren verbessert (Jobe et al., 1996). Auch in bovinen Surfactant-Präparationen verabreichte virale Vektoren wurden besser in der Lunge verteilt und besser von den Versuchstieren toleriert, als solche, die in isotoner Kochsalzlösung appliziert wurden (Katkin et al., 1997; Raczka et al., 1998).

Surfactant und non-virale Vektoren: Im Gegensatz zu den eher förderlichen Eigenschaften bei viralen Vektoren ist Surfactant bei non-viralen Vektoren tendenziell als hinderlich anzusehen. Bei der Transfektion der Lunge mit Lipoplexen zeigten sich schlechtere Transfektionsraten bei gleichzeitiger Applikation von natürlichem oder synthetischem Surfactant (Tsan et al., 1997) oder SP-B und SP-C (Duncan et al., 1997).

PEI-basierte Vektorsysteme wurden durch Surfactant nicht oder nur wenig beeinflusst (Ernst et al., 1999).

Surfactant und „nackte“ DNA: Die Aufnahme von „nackter“ Plasmid-DNA in die Lunge wurde unter Verwendung des synthetischen Surfactants Exosurf® von Raczka et al. (Raczka et al., 1998) untersucht. Dabei zeigte sich, dass entgegen der Erwartungen der Autoren keine Förderung sondern, im Gegenteil, eine Hemmung der Aufnahme eines Luciferase kodierenden Plasmids nach endotracheal Applikation im Mausmodell erfolgte. Ihre Interpretation dieser Ergebnisse war, dass Exosurf® möglicherweise die Interaktion von Plasmid und Membranproteinen inhibiert und folglich eine Endozytose stört. Jedoch unterscheidet sich Exosurf® deutlich in seiner Zusammensetzung von humanem oder natürlich gewonnenem Surfactant wie Alveofact® oder Curosurf®. Neben synthetisch erstellten Phospholipiden ist Exosurf® frei von Surfactant-Proteinen, die wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Wiederaufnahme und dem Recycling von Surfactant spielen (Ikegami, 2006). Spekuliert werden kann, dass dieser Recyclingprozess eine Rolle in der *in vivo* beobachteten Aufnahme von „nackter“ DNA spielt. Surfactant unterliegt physiologisch einer hohen Austauschrate (Jacobs et al., 1982), da er durch Zug- und Druckbelastung während der Atembewegung zu der Bildung von Vesikeln neigt. Diese werden von Typ II Alveolarzellen und Makrophagen endozytiert (Ikegami, 2006). Bei einer Bindung von DNA an diese Surfactant-Vesikel wäre eine gesteigerte Transfektion eben jener Zellen vorstellbar. Die Untersuchung dieses komplexen Mechanismus stellt jedoch hohe Anforderungen an den Versuchsaufbau. So müssten neben einer Luft-Wasser-Oberfläche an einem näherungsweise physiologischen Epithel auch die mechanischen Belastungen oder anderweitig induzierte Vesikel abgebildet werden. Da dies in dem in dieser Arbeit verwendeten Versuchsdesign keine Anwendung fand, bleibt dieser Mechanismus rein spekulativ und bedarf weiterer Untersuchung.

4.2 PEI-PEG Polymere als Vektorsystem *in vitro*

Als zweite Fragestellung dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich die Aufnahme von DNAzymen durch den Einsatz von PEI/DNAzym bzw. PEG-PEI/DNAzym-Polyplexen verbessern lässt.

Besonders bedingt durch die intensive Erforschung der siRNA (für dessen Erstbeschreibung (Fire et al., 1998) Andrew Z. Fire und Craig Mello 2006 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurden (Fire, 2007)) wurden parallel viele Studien zur Transfektion dieser Moleküle publiziert (Patil et al., 2005). DNAzyme und siRNA weisen als Oligonukleotide viele Ähnlichkeiten in Molekularstruktur und Größe auf. Allerdings gibt es zwischen den beiden Molekülgruppen auch entscheidende Unterschiede. So liegen die DNAzyme in Teilen als Doppelstrang vor und haben als DNA-Moleküle ander Zucker und zum Teil andere Nukleotide als die auf RNA basierenden siRNAs. Insgesamt ist aber anzunehmen, dass viele der Ergebnisse zur Transfektion von siRNA auf DNAzyme übertragbar sind. So ist den beiden Ansätzen ihr Nukleinsäure-Rückgrat gemeinsam, welches ihre therapeutische Applikation vor ähnliche Hürden stellt: Da DNA- und RNA-Moleküle aufgrund ihrer makromolekularen Struktur und negativen Ladung praktisch nicht spontan eine Zellmembran überwinden können (Meade and Dowdy, 2008) und in „nacktem“ Zustand zügig von Serum-Nukleasen abgebaut werden (Bumcrot et al., 2006), ist ihr Therapieerfolg abhängig von einem effizientem Vektor (Ozpolat et al., 2010). Die zwei Hauptgruppen der Vektoren für diesen Einsatz sind die viralen und non-viralen Vektoren (Aigner, 2007).

Die viralen Vektoren zeichnen sich durch eine hohe Effizienz im Gentransfer aus. Jedoch können sie auch starke Immunreaktionen hervorrufen (Flotte and Laube, 2001), besonders bei wiederholtem Einsatz (Yang et al., 1994). Non-virale Vektoren erreichen nicht immer die Transfektionseffizienz von viralen Vektoren (Heider et al., 2000), sind aber im Allgemeinen weniger immunogen und einfacher zu handhaben (Merdan et al., 2002). Unter den non-viralen Vektoren gehört PEI zu den am intensivsten untersuchten Systemen (Neu et al., 2005) und wird von vielen als Goldstandard zum Vergleich der Transfektionseffizienz angesehen (Basarkar and Singh, 2007). Zum Einsatz von PEI-Molekülen bei der Transfektion von siRNA sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurden bereits mehrere Studien veröffentlicht (Basarkar and Singh, 2007; Eliyahu et al., 2005), wobei PEI als effektiver Vektor gilt (Boussif et al., 1995; Goula et al., 1998). Speziell wird über Untersuchungen von PEI/DNAzym-Komplexen in der Literatur nur wenig berichtet. Tack et al. erforschten die Aufnahme eines c-myc-spezifischen DNAzyms mit Gold-PEI-Nanopartikeln (Tack et al., 2008) und dem strukturverwandtem Poly(Propylen-Imine) (PPI) *in vitro* in verschiedene Tumorzelllinien (Tack et al., 2006). In beiden Fällen berichteten sie über hohe Transfektionsraten und geringe Toxizität. Aufgrund Ergebnisse der von Tack et al. und der Ähnlichkeit in

Molekularstruktur und Größe zu siRNAs war anzunehmen, dass sich PEI für die Transfektion von 10-23 DNAzymen *in vitro* eignen sollte. Die Annahme wurde in den durchgeführten Versuchen bestätigt. Sowohl mit PEI als auch mit den verschiedenen getesteten PEI-PEG-Molekülen konnten hohe Transfektionsraten erreicht werden.

4.2.1 Über den Einfluss von PEG-Seitenketten

Es ist bekannt, dass PEI basierte Vektorsysteme sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zytotoxisch wirken (Poma and Di Giorgio, 2008). Parameter, die die Stärke des toxischen Effekts bestimmen sind neben Polymer-Konzentration und Einwirkzeit das Molekulargewicht und die Dichte der kationischen Ladungen des Polymers (Fischer et al., 2003a). Man geht davon aus, dass hauptsächlich freie geladene Aminogruppen an der Oberfläche des PEI-Polyplexes die Zellmembran schädigen. Um diese Aminogruppen abzuschirmen, wurden von Petersen et al. PEI Moleküle mit PEG Seitengruppen versehen (Petersen et al., 2002a), wodurch eine reduzierte Zytotoxizität von PEI/DNA-Komplexen erreicht werden konnte (Petersen et al., 2002b).

Dies deckt sich gut mit den Ergebnissen dieser vorliegenden Arbeit, in denen PEI/DNAzym-Komplexe ebenfalls deutlich stärker zytotoxisch wirkten als die untersuchten PEI-PEG/DNAzym-Komplexe (vgl. 3.2.1). Die vier hier untersuchten PEI-PEG/DNAzym-Komplexe wurden bereits von Mao et al. beschrieben und als PEI-PEG/siRNA-Komplexe untersucht (Mao et al., 2006). Die Moleküle setzen sich aus zwei Komponenten zusammen: einem verzweigt-kettigem 25 kDa PEI-Anteil und einer oder mehreren PEG-Seitenketten. Das Massenverhältnis beider Komponenten zueinander beträgt dabei ungefähr 1:1. Im Falle der leichtesten PEG-Seitenketten (550 Da) sind dabei pro PEI-Molekül 30 PEG-Moleküle vorhanden, während bei der schwersten Seitenkette (20 kDa) jedes PEI Molekül lediglich mit einer PEG-Seitenkette verbunden ist.

Mao et al. beschrieben, dass sich im Komplex mit siRNA die Polyplexe in ihrer Dichte und Transfektionseffizienz abhängig von der PEG-Seitenkette unterscheiden. Das mit vielen leichten Seitenketten ausgestattete PEI(25k)-g-PEG(550)30 führte zu relativ großen (300-400 nm) Komplexen, die erst bei einem N/P Verhältnis von 15 kompakt vorlagen, während die anderen PEI-PEG Moleküle bei N/P 3 kompakte ca. 150 nm große Polyplexe bildeten. Auch hier decken sich die Ergebnisse der siRNA-Komplexe relativ gut mit den Ergebnissen in dieser Arbeit zu DNAzym Komplexen. Die bestimmten Partikelgrößen des PEI(25k)-g-PEG(5kDa)4/hgd40-Komplexes lagen

zwischen 82 nm (N/P 12) und 120 nm (N/P 18). Quantitative Messungen der Aufnahme wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden von Mao et al. nicht durchgeführt. Bei der funktionellen Messung von Mao et al. mittels eines β -Galactosidase-Knock-Downs zeigten sich die besten Effizienzen bei den Komplexen mit Seitenketten größer 5 kDa: (PEI(25k)-g-PEG(5k)4 und PEI(25k)-g-PEG(20k)1) (Mao et al., 2006). Zhang et al. untersuchten ebenfalls die Effizienz von PEI-PEG/siRNA-Polyplexen. Auch hier waren Polyplexe mit 5 kDa aber auch 2 kDa Seitenketten besonders effizient (Zhang et al., 2008). Die Polyplexe wurden dabei um so besser aufgenommen, je geringer die Anzahl der Seitenketten war, was sich mit den Untersuchungen von Mao et al. deckt (Mao et al., 2006).

Bei der Untersuchung der unterschiedlichen PEI-PEG/DNAzym-Polyplexe in dieser Arbeit waren die Transfektionsergebnisse ebenfalls abhängig von der Menge und Größe der PEG-Seitenketten. Die höchsten Transfektionsraten wurden ebenfalls bei (PEI(25k)-g-PEG(5k)4 und PEI(25k)-g-PEG(20k)1) erreicht. Von Zhang et al. wurden keine PEG Seitenketten größer 5kDa untersucht, jedoch waren hier PEI-PEG-Polyplexe mit wenigen Seitenketten solchen mit vielen Seitenketten überlegen (Zhang et al., 2008).

4.2.2 Über den Einfluss unterschiedlicher N/P-Verhältnisse

Die Bildung der PEI/DNA-Komplexe erfolgt hauptsächlich über elektrostatische Wechselwirkungen (Bloomfield, 1996), Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte spielen wohl eine geringere Rolle (Bronich et al., 2001). Daher ist das Verhältnis von positiv geladenem PEI-Polymer und negativ geladener DNA zueinander von entscheidender Bedeutung. Es wird als Stickstoff/Phosphat-Verhältnis (N/P-Verhältnis) angegeben, wobei die Menge der Stickstoff Atome des PEI auf die Phosphat-Atome der DNA bezogen wird. Abhängig vom N/P-Verhältnis ändern sich für die Effizienz der Transfektion zentrale Eigenschaften des Komplexes: die Partikelgröße (Ogris et al., 1998; Wightman et al., 2001), , die Oberflächenladung (Tang et al., 2003) und die Abschirmung gegenüber RNAsen/DNAsen (Mao et al., 2006).

Durch die Komplexbildung erfolgt eine Kondensierung der DNA, deren Ausmaß ebenfalls abhängig vom N/P-Verhältnis ist. Erbacher et al. konnten eine Verkleinerung von PEI/DNA-Komplexen von mehr als 1000 nm bei N/P 2 zu 100-200 nm bei N/P 20 feststellen (Erbacher et al., 1999). Eine Partikelgröße kleiner 150-200 nm scheint dabei zu einer verbesserten Endozytose zu führen (Neu et al., 2005). Wie beschrieben lagen

die Partikelgrößen der in dieser Arbeit untersuchten PEI(25k)-g-PEG(5kDa)4/hgd40-Komplexe zwischen 82 nm (N/P 12) und 120 nm (N/P 18), somit in einem für die Transfektion idealem Bereich.

Neben der Partikelgröße wird auch die Oberflächenladung durch das N/P-Verhältnis beeinflusst. PEI/DNA-Komplexe mit niedrigen N/P-Verhältnissen im Bereich von 2 bis 5 neigen auf Grund ihrer geringen Oberflächenladung und den daraus resultierenden hydrophoben Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Bindungen dazu, sich zu Aggregaten zusammenzulagern (Erbacher et al., 1999). Bei höheren N/P-Verhältnissen nimmt die Oberflächenladung zu, woraus eine elektrostatische Abstoßung der Komplexe resultiert, die eine Aggregation verhindert und die Stabilität der Komplexe in Salzlösungen stabilisiert (Tang and Szoka, 1997).

In dieser Arbeit wurden *in vitro* N/P-Verhältnisse von 1 bis 10 untersucht. Dabei zeigte sich eine lineare Korrelation zwischen N/P-Verhältnis und aufgenommener DNAzym-Menge. Bei N/P 1 konnte im Vergleich die geringste Aufnahme gemessen werden, bei N/P 10 die stärkste. Da in diesem N/P-Bereich, der Literatur folgend, bei höheren N/P-Verhältnissen von geringerer Polyplex-Größe, höherer Oberflächenladung und geringerer Aggregation ausgegangen werden kann, und dies die Parameter sind, die zu einer verbesserten Transfektion führen, ist dieses Ergebnis zu erwarten gewesen.

4.2.3 Über die Aufnahme von PEI-Polyplexen

PEI ist dafür bekannt, über seine positiv geladenen Aminogruppen die Interaktion mit der anionischen Zellmembran zu fördern. Dieser Effekt ist wahrscheinlich ein wichtiger Faktor für die Aufnahme von PEI-Polyplexen. Jedoch sind Untersuchungen notwendig, um zu unterscheiden, ob PEI/DNAzym-Polyplexe lediglich an die Zellmembran gebunden wurden oder ob sie die Zellmembran überwinden konnten und dann intrazellulär vorliegen.

Um dies zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit konfokalmikroskopische Aufnahmen von mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten PEI(25k)-g-PEG(5kDa)4/hgd40-Komplexen transfizierten Zellen gemacht. Dabei zeigte sich, dass die Komplexe tatsächlich intrazellulär aufgenommen werden. Die Komplexe waren dabei jedoch nicht diffus verteilt sondern stark kondensiert und lagerten sich punktförmig zusammen. Ein Anfärben der Lysosomen bestätigte den Verdacht, dass es sich bei den Zusammenlagerungen um in Lysosomen gebundene Komplexe handelt. Bei sehr hohen

Dosen an PEI/DNAzym-Komplexen konnte intrazellulär eine relativ diffuse Verteilung und Anreicherung auch im Zellkern beobachtet werden.

Die beschriebenen Ergebnisse passen sehr gut zu der von Behr et al. postulierten Proton-Sponge-Hypothese (Boussif et al., 1995). Dieser Hypothese zufolge werden PEI-Komplexe nach Interaktion mit der Zellmembran endosomal aufgenommen. Nach Verschmelzung der Endosomen mit den Lysosomen werden die Endolysosomen mit einem H^+/Cl^- -Cotransporter angesäuert. Da PEI aber über seine Aminogruppen die H^+ -Ionen abpuffert, kommt es zu einem erhöhten osmotischen Druck, der den Vesikel rupturiert und die Komplexe in das Zytosol freisetzt (Yang and May, 2008). Die Aufnahme in angesäuerte endosomale Vesikel konnte durch unsere Untersuchungen bestätigt werden, d sich mit ähnlichen Untersuchungen über PEI/siRNA-Komplexe von Godbey et al. (Godbey et al., 1999) decken.

4.2.4 Schlussfolgerungen zur *in vitro* Transfektion von DNAzymen mit PEI und PEI-PEG

Zusammenfassend zeigten die PEI/DNAzym- und PEI-PEG/DNAzym-Polymere gute Transfektionseigenschaften *in vitro*. Die Ergebnisse sind dabei vergleichbar mit analogen Arbeiten anderer Arbeitsgruppen zu PEI/siRNA-Polymere, so dass von einer hohen Übertragbarkeit der siRNA-Ergebnisse für DNAzyme ausgegangen werden kann. Als besonders effizient stellten sich die PEI(25k)-g-PEG(5k)4 und PEI(25k)-g-PEG(20k)1 Komplexe zur Transfektion heraus. Wie bereits für siRNA-Polymere beschrieben, zeigten diese bei gleicher Transfektionseffizienz eine deutlich geringere Zytotoxizität als reine PEI/DNAzym-Polymere. Die transfizierte Menge an DNAzym war abhängig vom N/P-Verhältnis. Im Bereich von N/P 1 bis 10 konnte eine lineare Zunahme der aufgenommen DNAzym-Menge gemessen werden. Auf Grund der positiven Versuchsergebnisse wurde beschlossen, den PEI(25k)-g-PEG(5k)4 Polymer auf seine Eigenschaften *in vivo* zu untersuchen.

4.3 PEI-PEG Polymere als Vektorsystem *in vivo*

Ein therapeutisches Regime zur Anwendung von DNAzymen im murinen Asthma-Modell wurde bereits von Sel. et al. (Sel et al., 2008), basierend auf einem etablierten Modellsystem (Wegmann et al., 2005), publiziert. Neuartig in dem in dieser Arbeit durchgeführten Tierexperiment war die Kombination aus dem therapeutischen Asthma-

Regime von Sel et al. mit dem Einsatz eines PEI-PEG/DNAzym-Polyplexes. Dafür wurden in der vorliegenden Arbeit, wie von Wegmann et al. beschrieben, die Versuchstiere zunächst mit dem Protein OVA allergisch sensibilisiert. Einen Tag vor der Provokation der Lunge mit diesem Allergen wurde eine Therapie mit einem GATA-3-spezifischem DNAzym (hgd40) im Komplex mit PEI(25k)-g-PEG(5k)₄ begonnen. Diese Therapie erfolgte über einen Zeitraum von 4 Tagen. Über 3 Tage erfolgte parallel die Provokation mit dem Allergen als Aerosol (siehe auch Abbildung 10).

Unter diesem Versuchsschema verstarben allerdings 13 der Versuchstiere. Darunter waren 7 Tiere in der Gruppe, die mit dem freien Polymer (als Kontrolle) therapiert worden waren und 6 Tiere, die den PEI-PEG-Polyplex mit N/P 18 erhalten hatten. Bei den überlebenden Versuchstieren wurde eine Broncho-Alveoläre-Lavage (BAL) durchgeführt. Die Versuchstiere, die mit PEI(25k)-g-PEG(5k)₄ therapiert worden waren, zeigten eine stark erhöhte Zellzahl mit vorrangig neutrophilen Granulozyten. Die Menge dieser Entzündungszellen in der BAL korrelierte positiv mit dem applizierten N/P-Verhältnis.

Für die Untersuchung der Lungenfunktion unter Metacholin-Provokation zeigte sich ein der Zellzahl entsprechendes Bild. Versuchstiere, die ein hohes N/P-Verhältnis erhalten hatten, zeigten eine schlechtere Lungenfunktion also solche, die Komplexe mit einem niedrigerem N/P-Verhältnis erhielten. Es ist daher davon auszugehen, dass im durchgeführten Versuch durch Applikation von PEI-PEG-Polyplexen eine starke Entzündungsreaktion hervorgerufen wurde. Dabei zeigten Tiere, die mit einem niedrigen N/P-Verhältnis (N/P 6) behandelt wurden weniger Symptome als solche, die mit einem hohen N/P Verhältnis (N/P 18) oder freiem Polymer therapiert wurden.

Die beobachteten toxischen Effekte der PEI-PEG-Polyplexe decken sich gut mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die erst nach Durchführung unseres Experiments veröffentlicht wurden.

Beyerele et al. (Beyerle et al., 2010a) untersuchten die Reaktion von Zellkulturlinien auf ungebundene PEI- und PEI-PEG-Polymere im Genexpressions-Assay. Sie konnten dabei zeigen, dass reines PEI eine starke zytotoxische Wirkung hat, die bei PEI-PEG-Polymeren deutlich abgeschwächt ist. Gleichzeitig wurde nachgewiesen, dass das PEI-PEG-Polymere verglichen mit reinem PEI stärker proinflammatorisch wirken. Die genannten Autoren leiteten aus ihren *in vitro* Ergebnissen Sicherheitsbedenken für den *in vivo* Einsatz von PEI-PEG-Polymeren ab. Besondere Bedenken wurden für einen

repetitiven Einsatz geäußert, was wir durch unser Experiment bestätigen konnten. In einem späteren Experiment untersuchten sie die lokale Reaktion der Lunge nach einmaliger Gabe von PEI-PEG Polyplexen nach intratrachealer Applikation (Beyerle et al., 2011). Auch hier konnten sie deutliche proinflammatorische Effekte nachweisen. Im Unterschied zu dem in dieser Arbeit durchgeführten Experiment wurden dabei aber geringere Dosen (ca. Faktor 2 weniger) eingesetzt und nur einmalig appliziert. Die von uns eingesetzte höhere Menge an Polymer bietet sich als Erklärung für die in dieser Arbeit beobachteten schweren Nebenwirkungen an.

Allgemein lässt sich feststellen, dass kationische Polymere, wie z.B. PEI, Lipiddoppelschichten zerstören können (Hong et al., 2006; Leroueil et al., 2007), was zu einer Nekrose der Zelle und somit Entzündung führt. Besonders die freien Amingruppen spielen dabei eine Rolle, weshalb die Abschirmung dieser Gruppen, wie von Mao et al. beschrieben, zu einer reduzierten Toxizität führt. Diese Abschirmung ist abhängig von der Bildung stabiler Polyplexe. Unkomplexierte PEI-Polymere weisen so eine höhere Toxizität auf (Beyerle et al., 2009). Festzustellen ist auch, dass PEI basierte Polyplexe normalerweise einen Überschuss an unkomplexiertem PEI aufweisen der im Körper nicht abgebaut werden kann (Boeckle et al., 2004; Fahrmeir et al., 2007). Bei zunehmendem N/P-Verhältnis steigt die Menge des unkomplexierten PEIs, was eine Erklärung dafür liefert, warum in unserem Versuch die Experimentalgruppe mit hohem N/P-Verhältnis (N/P 18) in allen gemessenen Parametern (Anteil verstorbener Tiere, klinisches Erscheinungsbild, Menge neutrophiler Granulozyten in der BAL, AHR) schlechter abschnitt als die Versuchsgruppe mit niedrigem N/P-Verhältnis (N/P 6). Auch erhielt die Gruppe N/P 18 insgesamt die dreifache Menge Polymer verglichen mit der Gruppe N/P 6, was jedoch nicht das schlechte Abschneiden der Gruppe, die freies Polymer erhalten hat (PEI-PEG) erklären würde, die insgesamt die gleiche Dosis Polymer wie Gruppe N/P 6 erhielt.

Somit konnten wir in unserem Experiment die von Beyerle et al. (Beyerle et al., 2010a) auf *in vitro* Daten basierenden Bedenken zum repetitiven Einsatz von PEI-PEG Polymeren in der Lunge *in vivo* bestätigen.

4.4 Schlussfolgerungen

PEI und insbesondere PEG-PEI-Polymere scheinen für den *in vitro* Einsatz potente Transfektionsmittel zu sein. Vergleichbar zu PEI/siRNA-Polyplexen lieferten auch PEI/DNAzym-Polyplexe gute Transfektionsergebnisse. Im durchgeführten Tierexperiment wurde jedoch eine hohe Toxizität beobachtet. Insbesondere die tägliche Gabe des Polyplexes über vier Tage scheint eine starke Entzündungsreaktion in der Lunge hervorzurufen. Daher empfehlen sich PEI-PEG-Polymere in der untersuchten Form nicht als Vektorsystem für GATA-3-spezifische DNAzyme zur therapeutischen Beeinflussung des Asthma bronchiale. In dieser Anwendung müssten die Therapeutika über Jahre regelmäßig appliziert werden, was eine besonders hohe Verträglichkeit voraussetzt.

Insgesamt stellen Polyplexe aber wirkungsvolle Vektorsysteme dar, bei denen weitere Forschungsbemühungen potentiell zu deutlich verbesserter biologischer Verträglichkeit führen könnten. Wünschenswert wären so zum Beispiel eine stärkere Abschirmung toxischer Gruppen, die enzymatische Spaltbarkeit des Polymers um eine Elimination der Komplexe zu ermöglichen, und ein Rezeptor- oder Antikörper-vermitteltes spezifischeres „Zielsystem“ um die benötigte Dosis und unspezifische Nebenwirkungen zu reduzieren. Möglichweise ist es hier sogar erforderlich mehrere Ansatzpunkte zu kombinieren, um das Ziel eines effektiven und sicheren Vektors zu erreichen. Beispielhaft hierfür könnte die vor kurzem publizierte Arbeit von Ashley et al. sein, die einen komplexen, aus mehr als acht Komponenten bestehenden Vektor publizierten (Ashley et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte somit kein optimales Vektorsystem für die untersuchte Anwendung, die Aufnahme eines GATA-3 spezifischen DNAzyms in der Lunge zu verbessern, gefunden werden. Die untersuchten PEI-PEG Polymere liefern einen potentiellen Ansatz, dessen eingeschränkte biologische Verträglichkeit es jedoch zu überwinden gilt.

5 Zusammenfassung

Asthma bronchiale gehört weltweit zu den häufigsten chronischen Lungenerkrankungen. Eine wichtige Rolle in der Pathogenese des allergischen Asthmas spielen T-Helferzellen (TH2) für deren Differenzierung und Aktivierung der Transkriptionsfaktor GATA-3 essentiell ist. Durch lokale Applikation eines GATA-3 mRNA spaltenden DNAzyms - ein DNA-Oligonukleotid mit katalytischer Aktivität - konnte im Tiermodell ein Asthma Phänotyp bereits erfolgreich therapiert werden. Die Aufnahme der DNAzym-Moleküle in ihre Zielzellen ist jedoch auf Grund ihrer Ladung und Größe herausfordernd, so dass in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen wurde, ob natürliches Surfactant oder künstliche Vektoren die Aufnahme und somit die Wirksamkeit von GATA-3 spezifischen DNAzymen verbessern können.

Zur Untersuchung in vitro setzten wir dafür ein fluoreszenzmarkiertes DNAzym ein, dessen Aufnahme in verschiedene Zelllinien unter Einfluss von Surfactant sowie Polyethylenimin (PEI) und Polyethylenimin-Polyethylenglycol (PEI-PEG) Polymeren durchflusszytometrisch analysiert wurde. Zwei verschiedene Surfactant-Präparationen (Alveofact®, Curosurf®) führten dabei in verschiedenen Versuchsaufbauten zu keiner Veränderung der Aufnahme - unsere Ergebnisse liefern somit keinen Hinweis auf die in der Literatur vertretene Hypothese, Surfactant verbessere die Aufnahme von DNA in vitro. Die eingesetzten PEI und PEI-PEG Moleküle hingegen führten zu einer effizienten Transfektion des DNAzyms. Alle PEI-PEG Polymere zeigten dabei eine deutlich geringere Zytotoxizität als unmodifiziertes PEI. Das PEI(25kDa)-g-PEG(5kDa)₄ Molekül mit vier 5 kDa PEG-Seitenketten zeigte unter den untersuchten PEI-PEG Molekülen die höchste Transfektionseffizienz, so dass dieses für einen initialen in vivo Versuch ausgewählt wurde. In diesem Experiment wurde Mäusen mit einem experimentell induzierten Asthma Phänotyp einmal täglich über vier Tage parallel zur lokalen Allergenprovokation ein Komplex aus GATA-3 spezifischem DNAzym und PEI-PEG Polymer intratracheal verabreicht. Dieses Protokoll führte jedoch zu einer schweren, bei einigen Tieren sogar letalen Entzündung der Lunge. Der Effekt war dabei abhängig von der Menge des verabreichten Polymers und am ausgeprägtesten in den Tieren, die unkomplexiertes PEI-PEG ohne DNAzym erhielten.

Die von uns untersuchten DNAzym/PEI-PEG Komplexe erwiesen sich, ähnlich wie bereits beschriebene siRNA/PEI-PEG Komplexe, als effektive Vektoren in vitro. Die

beobachteten Nebenwirkungen in vivo deuten jedoch auf eine nicht unerhebliche Toxizität dieser Komplexe hin. Da für den Einsatz in der chronischen Erkrankung Asthma bronchiale von längeren Therapiezeiträumen auszugehen ist, sind dafür jedoch besonders gut verträgliche therapeutische Systeme erforderlich. Daher muss die weitere Entwicklung von Vektorsystemen für die lokale Applikation nukleinsäure-basierter Therapeutika zum Ziel haben, die toxischen Eigenschaften dieser Komplexe bei gleichen oder gar noch weiter verbesserten in vivo Transfektionseffizienzen signifikant zu reduzieren.

6 Summary

Bronchial Asthma is one of the most common chronic pulmonary diseases worldwide. T-helper cells (TH2) have been shown to play a central role in the pathogenesis of allergic asthma. Differentiation and activation of TH2 cells necessarily depends on the transcription factor GATA-3. It has been shown that local administration of a GATA-3 mRNA cleaving DNAzyme – a DNA-oligonucleotide with inherent catalytic activity – may significantly improve an asthmatic phenotype in mice. However, effective administration of “naked” DNAzymes represent a challenge since their cellular uptake is hindered by size and anionic character of the molecules. Hence, it was the goal of the present work to investigate whether natural surfactant or artificial vectors could improve DNAzyme uptake and thereby the therapeutic efficacy of this type of novel drugs.

In our in vitro experimental setup using different cell lines we analysed the uptake of a fluorochrome-labelled DNAzymes by flow cytometry under the influence of surfactant, Polyethylenimine (PEI) and Polyethylenimine-Polyethylene glycol (PEI-PEG) polymers. The two investigated surfactant preparations Alveofact® and Curosurf® did not influence DNAzyme uptake in our experiments. Consequently, our data do not support the hypothesis that surfactant could improve the uptake of DNA-based molecules in vitro. We did however observe an effective transfection of cells when PEI or PEI-PEG polymers were applied in the same experimental setup. All PEI-PEG polymers showed significantly less cytotoxicity compared to the unmodified PEI molecules. Among the PEI-PEG polymers PEI(25kDa)-g-PEG(5kDa)₄ with four 5 kDa PEG side chains proved to be the most efficient vector, and was therefore selected for an initial in vivo experiment. Mice with an experimentally induced allergic asthma phenotype were treated intratracheally with a complex of GATA-3 specific DNAzyme and PEI-PEG polymer once daily over a period of 4 days during the time of local allergen challenge. Unfortunately, this treatment regime led to severe, in several animals even fatal, lung inflammation. This effect depended on the administered polymer dose, and was most pronounced in animals treated with uncomplexed PEI-PEG without DNAzyme.

Taken together, the investigated DNAzyme/PEI-PEG complexes – similar to effects already known for siRNA/PEI-PEG complexes - proved to be efficient transfection vectors in vitro. The observed adverse reactions in vivo however, suggest a significant

toxic potential of these complexes. As the chronic disease condition bronchial asthma is expected to require long-term treatments, toxicologically safe systems are an absolute prerequisite for novel therapeutic options. Thus, future development of vector systems for an effective local application of nucleic acid-based drugs must aim at a significant reduction of toxic properties of such complexes paralleled by comparable or even improved transfection efficacies.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AHR	Atemwegshyperreagibilität
Ak	Antikörper
APC	Antigen Präsentierende Zellen
ASO	Antisense-Oligonukleotid
BAL	Bronchioalveoläre Lavage
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i> ,
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopie
d	Tag, Tage
Da	Dalton
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTAP	N-[-1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-Linked Immunosorbent Assay
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAM	<i>6-Carboxyfluorescein</i>
Fc	<i>framgment crystallizable</i>
FCS	Fetales Kälber Serum
FcεRI	Fcε-Rezeptor-I
FSC	<i>forward scatter</i>
GATA-3	GATA binding protein 3
gd	GATA-3-DNAzym
h	Stunde, Stunden
HE	Hämatoxilin Eosin
hgd	humanes GATA-3-DNAzym

i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL4R	Interleukin 4 Rezeptor
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
MCh	Metacholin
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute, Minuten
mRNA	Messenger RNA
N/P	Stickstoff/Phosphat-Verhältniss
OVA	Ovalbumin
PAS	<i>Periodic Acid Schiff</i>
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylen-Glycol
PEI	Polyethylenimin
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PTM	Pneumotachograph
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> Zellkulturmedium
s	Sekunde, Sekunden
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SP	Surfactant-Protein
SSC	<i>sideward scatter</i>
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell Rezeptor

T _H	T-Helferzelle
T _{H0}	Naive T-Helferzelle
T _{H1}	T-Helferzelle Typ 1
T _{H2}	T-Helferzelle Typ 2
TLR	Toll-like-Rezeptor
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulare Mechanismen des Asthma bronchiale (Valenta, 2002)	8
Abbildung 2: Wirkmechanismen von Antisense-Molekülen (Kurreck, 2003).....	11
Abbildung 3: Sekundärstruktur eines Ribozyms (Kurreck, 2003)	13
Abbildung 4: Sekundärstruktur eines 10-23 DNAzyms (Kurreck, 2003).....	14
Abbildung 5: Sekundärstruktur eines linearen PEI-Polymers.....	19
Abbildung 6: Sekundärstruktur eines verzweigt-kettigen PEI-Polymers (Ungaro et al., 2003).....	19
Abbildung 7: Aufbau der verwendeten PEI-PEG Polymere (Mao et al., 2006)	22
Abbildung 8: Darstellung zwei verschiedener LA-4 Zellpopulationen in Forward und Sideward Scatter	29
Abbildung 9: Beispiel für die Einteilung in „transfizierte“ und „nicht transfizierte“ Zellen.....	30
Abbildung 10: Zeitlicher Ablauf des durchgeführten Tierversuchs.....	33
Abbildung 11: Schematische Darstellung eines Head-out Body-Plethysmographens (nach Dr. M. Wegmann).....	36
Abbildung 12: Transfektion von A549 Zellen mit Alveofact®-Surfactant	40
Abbildung 13: Transfektion von BEAS-2B Zellen mit Alveofact®-Surfactant	41
Abbildung 14: Transfektion von Jurkat-Zellen mit Alveofact®-Surfactant	42
Abbildung 15: Transfektion von Jurkat Zellen mit Curosurf®-Surfactant	43
Abbildung 16: Transfektion von BEAS-2B Zellen mit Curosurf®-Surfactant.....	43
Abbildung 17: Transfektion von A549 Zellen mit Alveofact® -Surfactant	44
Abbildung 18: Vergleich der Transfektion von PEI(25kDa) und PEI(25kDa)-g-PEG(2kDa)10	45
Abbildung 19: Transfektion von LA-4 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen PEI	46
Abbildung 20: Transfektion von EL-4 Zellen mit unterschiedlichen Polymeren	47
Abbildung 21: Transfektion von LA-4 Zellen unter Verwendung unterschiedlicher N/P-Ratios.....	48
Abbildung 22: Transfektion von LA-4 Zellen unter Verwendung unterschiedlicher N/P-Ratios.....	49
Abbildung 23: Analyse der Transfektion von LA4 Zellen im Konfokalmikroskop	51

Abbildung 24: Färbung der Lysosomen nach Transfektion von A549 Zellen.....	52
Abbildung 25: Messung der Polyplex-Größe.....	53
Abbildung 26: Messung Zeta-Potentials	54
Abbildung 27: Messung der MCh50-Konzentration als Maß der AHR.....	55
Abbildung 28: Gesamtzellzahl in der BAL	56
Abbildung 29: Zelldifferenzierung der BAL.....	57
Abbildung 30: Absolute Menge Neutrophiler Granulozyten in der BAL.....	58

9 Quellenverzeichnis

- Aigner, A. 2007. Nonviral in vivo delivery of therapeutic small interfering RNAs. *Curr Opin Mol Ther.* 9:345-352.
- Akhtar, S., M.D. Hughes, A. Khan, M. Bibby, M. Hussain, Q. Nawaz, J. Double, and P. Sayyed. 2000. The delivery of antisense therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 44:3-21.
- Akhtar, S., and R.L. Juliano. 1992. Cellular uptake and intracellular fate of antisense oligonucleotides. *Trends Cell Biol.* 2:139-144.
- Asher, M.I., S. Montefort, B. Bjorksten, C.K. Lai, D.P. Strachan, S.K. Weiland, and H. Williams. 2006. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet.* 368:733-743.
- Ashley, C.E., E.C. Carnes, G.K. Phillips, D. Padilla, P.N. Durfee, P.A. Brown, T.N. Hanna, J. Liu, B. Phillips, M.B. Carter, N.J. Carroll, X. Jiang, D.R. Dunphy, C.L. Willman, D.N. Petsev, D.G. Evans, A.N. Parikh, B. Chackerian, W. Wharton, D.S. Peabody, and C.J. Brinker. 2011. The targeted delivery of multicomponent cargos to cancer cells by nanoporous particle-supported lipid bilayers. *Nat Mater.* 10:389-397.
- Bacharier, L.B., H. Jabara, and R.S. Geha. 1998. Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation. *Int Arch Allergy Immunol.* 115:257-269.
- Basarkar, A., and J. Singh. 2007. Nanoparticulate systems for polynucleotide delivery. *Int J Nanomedicine.* 2:353-360.
- Beasley, R., W.R. Roche, J.A. Roberts, and S.T. Holgate. 1989. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis.* 139:806-817.
- Berend, N., C.M. Salome, and G.G. King. 2008. Mechanisms of airway hyperresponsiveness in asthma. *Respirology.* 13:624-631.
- Bergeron, C., and L.P. Boulet. 2006. Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation. *Chest.* 129:1068-1087.
- Beyerle, A., A. Braun, O. Merkel, F. Koch, T. Kissel, and T. Stoecker. 2011. Comparative in vivo study of poly(ethylene imine)/siRNA complexes for pulmonary delivery in mice. *J Control Release.*

- Beyerle, A., S. Höbel, F. Czubayko, H. Schulz, T. Kissel, A. Aigner, and T. Stoecker. 2009. In vitro cytotoxic and immunomodulatory profiling of low molecular weight polyethylenimines for pulmonary application. *Toxicol In Vitro*. 23:500-508.
- Beyerle, A., M. Irmeler, J. Beckers, T. Kissel, and T. Stoecker. 2010a. Toxicity pathway focused gene expression profiling of PEI-based polymers for pulmonary applications. *Mol Pharm*. 7:727-737.
- Beyerle, A., O. Merkel, T. Stoecker, and T. Kissel. 2010b. PEGylation affects cytotoxicity and cell-compatibility of poly(ethylene imine) for lung application: structure-function relationships. *Toxicol Appl Pharmacol*. 242:146-154.
- Bloomfield, V.A. 1996. DNA condensation. *Curr Opin Struct Biol*. 6:334-341.
- Boeckle, S., K. von Gersdorff, S. van der Piepen, C. Culmsee, E. Wagner, and M. Ogris. 2004. Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. *J Gene Med*. 6:1102-1111.
- Boussif, O., F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J.P. Behr. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:7297-7301.
- Breaker, R.R., and G.F. Joyce. 1994. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem Biol*. 1:223-229.
- Bronich, T., A.V. Kabanov, and L.A. Marky. 2001. A thermodynamic characterization of the interaction of a cationic copolymer with DNA. *Journal of Physical Chemistry*. 105:6042-6050.
- Brus, C., H. Petersen, A. Aigner, F. Czubayko, and T. Kissel. 2004. Efficiency of polyethylenimines and polyethylenimine-graft-poly (ethylene glycol) block copolymers to protect oligonucleotides against enzymatic degradation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 57:427-430.
- Buhl, R., D. Berdel, C.P. Criece, A. Gillissen, P. Kardos, C. Kroegel, W. Leupold, H. Lindemann, H. Magnussen, D. Nowak, D. Pfeiffer-Kascha, K. Rabe, M. Rolke, G. Schultze-Werninghaus, H. Sitter, D. Ukena, C. Vogelmeier, T. Welte, R. Wettengel, and H. Worth. 2006. [Guidelines for diagnosis and treatment of asthma patients]. *Pneumologie*. 60:139-177.
- Bumcrot, D., M. Manoharan, V. Koteliansky, and D.W. Sah. 2006. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol*. 2:711-719.
- Capecchi, M.R. 1980. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*. 22:479-488.

- Carroll, N.G., C. Cooke, and A.L. James. 1997. Bronchial blood vessel dimensions in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 155:689-695.
- Castanotto, D., and J.J. Rossi. 2009. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature.* 457:426-433.
- Chan, J.H., S. Lim, and W.S. Wong. 2006. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 33:533-540.
- Cieslewicz, G., A. Tomkinson, A. Adler, C. Duez, J. Schwarze, K. Takeda, K.A. Larson, J.J. Lee, C.G. Irvin, and E.W. Gelfand. 1999. The late, but not early, asthmatic response is dependent on IL-5 and correlates with eosinophil infiltration. *J Clin Invest.* 104:301-308.
- Classen, M., V. Diehl, K. Kochsiek, M. Hallek, M. Böhm, and W. Schmiegel. 2004. Innere Medizin. Classen, M.; Diehl, V.; Kochsiek, K.; Hallek, M.; Böhm, M.; Schmiegel, W.;
- Contopoulos-Ioannidis, D.G., I.N. Kouri, and J.P. Ioannidis. 2007. Genetic predisposition to asthma and atopy. *Respiration.* 74:8-12.
- Crooke, S.T. 2004. Antisense strategies. *Curr Mol Med.* 4:465-487.
- Curley, A.E., and H.L. Halliday. 2001. The present status of exogenous surfactant for the newborn. *Early Hum Dev.* 61:67-83.
- D'Amato, G. 2000. Urban air pollution and plant-derived respiratory allergy. *Clin Exp Allergy.* 30:628-636.
- Davis, M.M., J.J. Boniface, Z. Reich, D. Lyons, J. Hampl, B. Arden, and Y. Chien. 1998. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol.* 16:523-544.
- Densmore, C.L. 2006. Advances in noninvasive pulmonary gene therapy. *Curr Drug Deliv.* 3:55-63.
- Dietel, M. 2008. Harrisons Innere Medizin. 2 Bände. Dudenhausen, J. ; Suttorp, N.
- Duncan, J.E., J.A. Whitsett, and A.D. Horowitz. 1997. Pulmonary surfactant inhibits cationic liposome-mediated gene delivery to respiratory epithelial cells in vitro. *Hum Gene Ther.* 8:431-438.
- Ebina, M., T. Takahashi, T. Chiba, and M. Motomiya. 1993. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis.* 148:720-726.

- Eliyahu, H., Y. Barenholz, and A.J. Domb. 2005. Polymers for DNA delivery. *Molecules*. 10:34-64.
- Emilsson, G.M., and R.R. Breaker. 2002. Deoxyribozymes: new activities and new applications. *Cell Mol Life Sci*. 59:596-607.
- Erbacher, P., T. Bettinger, P. Belguise-Valladier, S. Zou, J.L. Coll, J.P. Behr, and J.S. Remy. 1999. Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI). *J Gene Med*. 1:210-222.
- Ernst, N., S. Ulrichskotter, W.A. Schmalix, J. Radler, R. Galneder, E. Mayer, S. Gersting, C. Plank, D. Reinhardt, and J. Rosenecker. 1999. Interaction of liposomal and polycationic transfection complexes with pulmonary surfactant. *J Gene Med*. 1:331-340.
- Fahrmeir, J., M. Gunther, N. Tietze, E. Wagner, and M. Ogris. 2007. Electrophoretic purification of tumor-targeted polyethylenimine-based polyplexes reduces toxic side effects in vivo. *J Control Release*. 122:236-245.
- Finotto, S., G.T. De Sanctis, H.A. Lehr, U. Herz, M. Buerke, M. Schipp, B. Bartsch, R. Atreya, E. Schmitt, P.R. Galle, H. Renz, and M.F. Neurath. 2001. Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *J Exp Med*. 193:1247-1260.
- Finotto, S., M.F. Neurath, J.N. Glickman, S. Qin, H.A. Lehr, F.H. Green, K. Ackerman, K. Haley, P.R. Galle, S.J. Szabo, J.M. Drazen, G.T. De Sanctis, and L.H. Glimcher. 2002. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science*. 295:336-338.
- Finsinger, D., J.S. Remy, P. Erbacher, C. Koch, and C. Plank. 2000. Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery. *Gene Therapy*. 7:1183-1192.
- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391:806-811.
- Fire, A.Z. 2007. Gene silencing by double-stranded RNA (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 46:6966-6984.
- Fischer, D., Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, and T. Kissel. 2003a. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*. 24:1121-1131.
- Fischer, D., Y.X. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, and T. Kissel. 2003b. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*. 24:1121-1131.

- Fisher, K.D., K. Ulbrich, V. Subr, C.M. Ward, V. Mautner, D. Blakey, and L.W. Seymour. 2000. A versatile system for receptor-mediated gene delivery permits increased entry of DNA into target cells, enhanced delivery to the nucleus and elevated rates of transgene expression. *Gene Ther.* 7:1337-1343.
- Flotte, T.R., and B.L. Laube. 2001. Gene therapy in cystic fibrosis. *Chest.* 120:124S-131S.
- Fujiwara, T., H. Maeta, S. Chida, T. Morita, Y. Watabe, and T. Abe. 1980. Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. *Lancet.* 1:55-59.
- Godbey, W.T., K.K. Wu, and A.G. Mikos. 1999. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:5177-5181.
- Goula, D., J.S. Remy, P. Erbacher, M. Wasowicz, G. Levi, B. Abdallah, and B.A. Demeneix. 1998. Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *Gene Ther.* 5:712-717.
- Gould, H.J., and B.J. Sutton. 2008. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol.* 8:205-217.
- Guerrier-Takada, C., K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, and S. Altman. 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell.* 35:849-857.
- Halliday, H.L. 2005. History of surfactant from 1980. *Biol Neonate.* 87:317-322.
- Hamilton, A.J., and D.C. Baulcombe. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.* 286:950-952.
- Hawgood, S., M. Derrick, and F. Poulain. 1998. Structure and properties of surfactant protein B. *Biochim Biophys Acta.* 1408:150-160.
- Heider, H., S.B. Verca, S. Rusconi, and R. Asmis. 2000. Comparison of lipid-mediated and adenoviral gene transfer in human monocyte-derived macrophages and COS-7 cells. *Biotechniques.* 28:260-265, 268-270.
- Heller, L.C., and R. Heller. 2006. In vivo electroporation for gene therapy. *Hum Gene Ther.* 17:890-897.
- Ho, I.C., and S.Y. Pai. 2007. GATA-3 - not just for Th2 cells anymore. *Cell Mol Immunol.* 4:15-29.
- Holgate, S.T. 1997. Asthma genetics: waiting to exhale. *Nat Genet.* 15:227-229.

- Holt, P.G., and J.W. Upham. 2004. The role of dendritic cells in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 4:39-44.
- Homer, R.J., and J.A. Elias. 2000. Consequences of long-term inflammation. Airway remodeling. *Clin Chest Med.* 21:331-343, ix.
- Hong, S., P.R. Leroueil, E.K. Janus, J.L. Peters, M.M. Kober, M.T. Islam, B.G. Orr, J.R. Baker, and M.M. Banaszak Holl. 2006. Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability. *Bioconjug Chem.* 17:728-734.
- Hsieh, C.S., S.E. Macatonia, C.S. Tripp, S.F. Wolf, A. O'Garra, and K.M. Murphy. 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science.* 260:547-549.
- Ikegami, M. 2006. Surfactant catabolism. *Respirology.* 11 Suppl:S24-27.
- Jacobs, H., A. Jobe, M. Ikegami, and S. Jones. 1982. Surfactant phosphatidylcholine source, fluxes, and turnover times in 3-day-old, 10-day-old, and adult rabbits. *J Biol Chem.* 257:1805-1810.
- Jobe, A.H., T. Ueda, J.A. Whitsett, B.C. Trapnell, and M. Ikegami. 1996. Surfactant enhances adenovirus-mediated gene expression in rabbit lungs. *Gene Ther.* 3:775-779.
- Kamiya, H., H. Tsuchiya, J. Yamazaki, and H. Harashima. 2001. Intracellular trafficking and transgene expression of viral and non-viral gene vectors. *Adv Drug Deliv Rev.* 52:153-164.
- Karow. 2010. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Thomas Karwo. 1332 pp.
- Katkin, J.P., R.C. Husser, C. Langston, and S.E. Welty. 1997. Exogenous surfactant enhances the delivery of recombinant adenoviral vectors to the lung. *Hum Gene Ther.* 8:171-176.
- Kichler, A., M. Chillon, C. Leborgne, O. Danos, and B. Frisch. 2002. Intranasal gene delivery with a polyethylenimine-PEG conjugate. *Journal of Controlled Release.* 81:379-388.
- Kirby, B.J., and E.F. Hasselbrink. 2004. Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. *Electrophoresis.* 25:187-202.
- Kircheis, R., L. Wightman, and E. Wagner. 2001. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev.* 53:341-358.

- Kruger, K., P.J. Grabowski, A.J. Zaug, J. Sands, D.E. Gottschling, and T.R. Cech. 1982. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*. 31:147-157.
- Kuroki, Y., and H. Sano. 1999. Functional roles and structural analysis of lung collectins SP-A and SP-D. *Biol Neonate*. 76 Suppl 1:19-21.
- Kurreck, J. 2003. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem*. 270:1628-1644.
- Kurreck, J., B. Bieber, R. Jahnel, and V.A. Erdmann. 2002. Comparative study of DNA enzymes and ribozymes against the same full-length messenger RNA of the vanilloid receptor subtype I. *J Biol Chem*. 277:7099-7107.
- Kwon, S.M., H.Y. Nam, T. Nam, K. Park, S. Lee, K. Kim, I.C. Kwon, J. Kim, D. Kang, J.H. Park, and S.Y. Jeong. 2008. In vivo time-dependent gene expression of cationic lipid-based emulsion as a stable and biocompatible non-viral gene carrier. *J Control Release*. 128:89-97.
- Lambrecht, B.N., H.C. Hoogsteden, and R.A. Pauwels. 2001. Dendritic cells as regulators of the immune response to inhaled allergen: recent findings in animal models of asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 124:432-446.
- Leaman, D.W., F.J. Longano, J.R. Okicki, K.F. Soike, P.F. Torrence, R.H. Silverman, and H. Cramer. 2002. Targeted therapy of respiratory syncytial virus in African green monkeys by intranasally administered 2-5A antisense. *Virology*. 292:70-77.
- Lemanske, R.F. 2004. Viral infections and asthma inception. *J Allergy Clin Immunol*. 114:1023-1026.
- Leroueil, P.R., S. Hong, A. Mecke, J.R. Baker, B.G. Orr, and M.M. Banaszak Holl. 2007. Nanoparticle interaction with biological membranes: does nanotechnology present a Janus face? *Acc Chem Res*. 40:335-342.
- Lewin, A.S., and W.W. Hauswirth. 2001. Ribozyme gene therapy: applications for molecular medicine. *Trends Mol Med*. 7:221-228.
- Luo, D., and W.M. Saltzman. 2000. Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol*. 18:33-37.
- Mantzouranis, E.C. 2008. Taking your child's breath away--the extension of asthma's global reach. *N Engl J Med*. 358:1211-1213.
- Mao, S., M. Neu, O. Germershaus, O. Merkel, J. Sitterberg, U. Bakowsky, and T. Kissel. 2006. Influence of polyethylene glycol chain length on the physicochemical and biological properties of poly(ethylene imine)-graft-

- poly(ethylene glycol) block copolymer/SiRNA polyplexes. *Bioconjug Chem.* 17:1209-1218.
- Masoli, M., D. Fabian, S. Holt, and R. Beasley. 2004. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy.* 59:469-478.
- Meade, B.R., and S.F. Dowdy. 2008. Enhancing the cellular uptake of siRNA duplexes following noncovalent packaging with protein transduction domain peptides. *Adv Drug Deliv Rev.* 60:530-536.
- Merdan, T., J. Kopecek, and T. Kissel. 2002. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 54:715-758.
- Meyer, K.B., M.M. Thompson, M.Y. Levy, L.G. Barron, and F.C. Szoka, Jr. 1995. Intratracheal gene delivery to the mouse airway: characterization of plasmid DNA expression and pharmacokinetics. *Gene Ther.* 2:450-460.
- Miescher, S.M., and M. Vogel. 2002. Molecular aspects of allergy. *Mol Aspects Med.* 23:413-462.
- Moret, I., J.E. Peris, V.M. Guillem, M. Benet, F. Revert, F. Dasi, A. Crespo, and S.F. Alino. 2001. Stability of PEI-DNA and DOTAP-DNA complexes: effect of alkaline pH, heparin and serum. *Journal of Controlled Release.* 76:169-181.
- Murphy, K.M., and S.L. Reiner. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol.* 2:933-944.
- Murphy, R.M. 1997. Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what can we learn? *Curr Opin Biotechnol.* 8:25-30.
- Nakamura, Y., O. Ghaffar, R. Olivenstein, R.A. Taha, A. Soussi-Gounni, D.H. Zhang, A. Ray, and Q. Hamid. 1999. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 103:215-222.
- Neu, M., D. Fischer, and T. Kissel. 2005. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *J Gene Med.* 7:992-1009.
- Nguyen, H.K., P. Lemieux, S.V. Vinogradov, C.L. Gebhart, N. Guerin, G. Paradis, T.K. Bronich, V.Y. Alakhov, and A.V. Kabanov. 2000. Evaluation of polyether-polyethyleneimine graft copolymers as gene transfer agents. *Gene Ther.* 7:126-138.
- North, G. 1989. Nobel prizes: chemistry. RNA's catalytic role. *Nature.* 341:556.

- Nyce, J.W., and W.J. Metzger. 1997. DNA antisense therapy for asthma in an animal model. *Nature*. 385:721-725.
- Ogris, M., S. Brunner, S. Schuller, R. Kircheis, and E. Wagner. 1999. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Therapy*. 6:595-605.
- Ogris, M., P. Steinlein, M. Kursa, K. Mechtler, R. Kircheis, and E. Wagner. 1998. The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther.* 5:1425-1433.
- Ordonez, C.L., R. Khashayar, H.H. Wong, R. Ferrando, R. Wu, D.M. Hyde, J.A. Hotchkiss, Y. Zhang, A. Novikov, G. Dolganov, and J.V. Fahy. 2001. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am J Respir Crit Care Med*. 163:517-523.
- Ozpolat, B., A.K. Sood, and G. Lopez-Berestein. 2010. Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer. *J Intern Med*. 267:44-53.
- Patil, S.D., D.G. Rhodes, and D.J. Burgess. 2005. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *AAPS J*. 7:E61-77.
- Pearce, N., N. Ait-Khaled, R. Beasley, J. Mallol, U. Keil, E. Mitchell, and C. Robertson. 2007. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*. 62:758-766.
- Peracchi, A. 2005. DNA catalysis: potential, limitations, open questions. *Chembiochem*. 6:1316-1322.
- Persson, C.G., M. Andersson, L. Greiff, C. Svensson, J.S. Erjefalt, F. Sundler, P. Wollmer, U. Alkner, I. Erjefalt, B. Gustafsson, and et al. 1995. Airway permeability. *Clin Exp Allergy*. 25:807-814.
- Petersen, H., P.M. Fechner, D. Fischer, and T. Kissel. 2002a. Synthesis, characterization, and biocompatibility of polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) block copolymers. *Macromolecules*. 35:6867-6874.
- Petersen, H., P.M. Fechner, A.L. Martin, K. Kunath, S. Stolnik, C.J. Roberts, D. Fischer, M.C. Davies, and T. Kissel. 2002b. Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system. *Bioconjug Chem*. 13:845-854.

- Poma, A., and M.L. Di Giorgio. 2008. Toxicogenomics to improve comprehension of the mechanisms underlying responses of in vitro and in vivo systems to nanomaterials: a review. *Curr Genomics*. 9:571-585.
- Racioppi, L., F. Ronchese, L.A. Matis, and R.N. Germain. 1993. Peptide-major histocompatibility complex class II complexes with mixed agonist/antagonist properties provide evidence for ligand-related differences in T cell receptor-dependent intracellular signaling. *J Exp Med*. 177:1047-1060.
- Raczka, E., J.F. Kukowska-Latallo, M. Rymaszewski, C. Chen, and J.R. Baker, Jr. 1998. The effect of synthetic surfactant Exosurf on gene transfer in mouse lung in vivo. *Gene Ther*. 5:1333-1339.
- Reddel, R.R., Y. Ke, B.I. Gerwin, M.G. McMenamin, J.F. Lechner, R.T. Su, D.E. Brash, J.B. Park, J.S. Rhim, and C.C. Harris. 1988. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res*. 48:1904-1909.
- Renz, H., A. Kaminski, and P.I. Pfefferle. 2008. Allergieforschung in Deutschland. Deutsche Gesellschaft für Allergologie und Klinische Immunologie.
- Rice, W.R., and F.M. Singleton. 1988. Regulation of surfactant phospholipid secretion from isolated rat alveolar type II cells by lectins. *Biochim Biophys Acta*. 958:205-210.
- RKI. 2006. Asthma bronchiale.
- Roche, W.R., R. Beasley, J.H. Williams, and S.T. Holgate. 1989. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*. 1:520-524.
- Roggen, E.L., N.K. Soni, and G.R. Verheyen. 2006. Respiratory immunotoxicity: an in vitro assessment. *Toxicol In Vitro*. 20:1249-1264.
- Ross, G.F., R.E. Morris, G. Ciraolo, K. Huelsman, M. Bruno, J.A. Whitsett, J.E. Baatz, and T.R. Korfhagen. 1995. Surfactant protein A-polylysine conjugates for delivery of DNA to airway cells in culture. *Hum Gene Ther*. 6:31-40.
- Sahai Srivastava, B.I., and J. Minowada. 1973. Terminal deoxynucleotidyl transferase activity in a cell line (molt-4) derived from the peripheral blood of a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 51:529-535.
- Santoro, S.W., and G.F. Joyce. 1997. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:4262-4266.
- Santoro, S.W., and G.F. Joyce. 1998. Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. *Biochemistry*. 37:13330-13342.

- Schmitt, E., R. Van Brandwijk, H.G. Fischer, and E. Rude. 1990. Establishment of different T cell sublines using either interleukin 2 or interleukin 4 as growth factors. *Eur J Immunol.* 20:1709-1715.
- Schneider, U., H.U. Schwenk, and G. Bornkamm. 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer.* 19:621-626.
- Sel, S., M. Wegmann, T. Dicke, W. Henke, A.O. Yildirim, H. Renz, and H. Garn. 2008. Effective prevention and therapy of experimental allergic asthma using a GATA-3-specific DNAzyme. *J Allergy Clin Immunol.* 121:910-916 e915.
- Sioud, M., and P.O. Iversen. 2005. Ribozymes, DNAzymes and small interfering RNAs as therapeutics. *Curr Drug Targets.* 6:647-653.
- Sitzmann, F.C. 2002. Pädiatrie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 992 pp.
- Stoner, G.D., Y. Kikkawa, A.J. Kniazeff, K. Miyai, and R.M. Wagner. 1975. Clonal isolation of epithelial cells from mouse lung adenoma. *Cancer Res.* 35:2177-2185.
- Strachan, D.P. 2000. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax.* 55 Suppl 1:S2-10.
- Suh, J., H.J. Paik, and B.K. Hwang. 1994. Ionization of Poly(Ethylenimine) and Poly(Allyamine) at various pHS. *Bioorganic Chemistry.* 22:318-327.
- Tack, F., A. Bakker, S. Maes, N. Dekeyser, M. Bruining, C. Elissen-Roman, M. Janicot, H.M. Janssen, B.F. De Waal, P.M. Fransen, X. Lou, E.W. Meijer, A. Arien, and M.E. Brewster. 2006. Dendrimeric poly(propylene-imines) as effective delivery agents for DNAzymes: toxicity, in vitro transfection and in vivo delivery. *J Control Release.* 116:e26-28.
- Tack, F., M. Noppe, A. Van Dijck, N. Dekeyzer, B.J. Van Der Leede, A. Bakker, W. Wouters, M. Janicot, and M.E. Brewster. 2008. Delivery of a DNAzyme targeting c-myc to HT29 colon carcinoma cells using a gold nanoparticulate approach. *Pharmazie.* 63:221-225.
- Tang, G.P., J.M. Zeng, S.J. Gao, Y.X. Ma, L. Shi, Y. Li, H.P. Too, and S. Wang. 2003. Polyethylene glycol modified polyethylenimine for improved CNS gene transfer: effects of PEGylation extent. *Biomaterials.* 24:2351-2362.
- Tang, M.X., and F.C. Szoka. 1997. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther.* 4:823-832.

- Thierry, A.R., E. Vives, J.P. Richard, P. Prevot, C. Martinand-Mari, I. Robbins, and B. Lebleu. 2003. Cellular uptake and intracellular fate of antisense oligonucleotides. *Curr Opin Mol Ther.* 5:133-138.
- Tsan, M.F., G.L. Tsan, and J.E. White. 1997. Surfactant inhibits cationic liposome-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther.* 8:817-825.
- Ungaro, F., G. De Rosa, A. Miro, and F. Quaglia. 2003. Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations. *In J Pharm Biomed Anal.* Vol. 31, England. 143-149.
- Valenta, R. 2002. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat Rev Immunol.* 2:446-453.
- van Iwaarden, F., B. Welmers, J. Verhoef, H.P. Haagsman, and L.M. van Golde. 1990. Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2:91-98.
- van Iwaarden, J.F., J.A. van Strijp, M.J. Ebskamp, A.C. Welmers, J. Verhoef, and L.M. van Golde. 1991. Surfactant protein A is opsonin in phagocytosis of herpes simplex virus type 1 by rat alveolar macrophages. *Am J Physiol.* 261:L204-209.
- Vassilev, V.B., L.H. Gil, and R.O. Donis. 2001. Microparticle-mediated RNA immunization against bovine viral diarrhea virus. *Vaccine.* 19:2012-2019.
- Wegmann, M., H. Fehrenbach, A. Fehrenbach, T. Held, C. Schramm, H. Garn, and H. Renz. 2005. Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy.* 35:1263-1271.
- Weiss, D.J. 2002. Delivery of gene transfer vectors to lung: obstacles and the role of adjunct techniques for airway administration. *Mol Ther.* 6:148-152.
- Wightman, L., R. Kircheis, V. Rossler, S. Carotta, R. Ruzicka, M. Kurs, and E. Wagner. 2001. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med.* 3:362-372.
- Wills-Karp, M. 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol.* 17:255-281.
- Wu, H., W.F. Lima, H. Zhang, A. Fan, H. Sun, and S.T. Crooke. 2004. Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *J Biol Chem.* 279:17181-17189.
- Yan, C.N., F. Li, C. Patterson, and M.S. Runge. 1998. High-voltage and high-salt buffer facilitates electroporation of human aortic smooth-muscle cells. *Biotechniques.* 24:590-592.

- Yang, S., and S. May. 2008. Release of cationic polymer-DNA complexes from the endosome: A theoretical investigation of the proton sponge hypothesis. *J Chem Phys.* 129:185105.
- Yang, Y., F.A. Nunes, K. Berencsi, E.E. Furth, E. Gonczol, and J.M. Wilson. 1994. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:4407-4411.
- Zhang, X., S.R. Pan, H.M. Hu, G.F. Wu, M. Feng, W. Zhang, and X. Luo. 2008. Poly(ethylene glycol)-block-polyethylenimine copolymers as carriers for gene delivery: effects of PEG molecular weight and PEGylation degree. *J Biomed Mater Res A.* 84:795-804.
- Zhu, J., B. Min, J. Hu-Li, C.J. Watson, A. Grinberg, Q. Wang, N. Killeen, J.F. Urban, Jr., L. Guo, and W.E. Paul. 2004. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat Immunol.* 5:1157-1165.
- Zhu, J., H. Yamane, J. Cote-Sierra, L. Guo, and W.E. Paul. 2006. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res.* 16:3-10.

10 Verzeichnis akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:

Vorklinischer Studienabschnitt:

Aumüller, Basler, Cetin, Daut, del Rey, Eilers, Feuser, Gemsa, Geus, Grundmann, Hasilik, Kern, Koolman, Lang, Lemansky, Lill, Liss, Löffler, Mandrek, Mueller, Neumüller, Rausch, Röhm, Röper, Seifert, Seitz, Suske, Steininger, Sundermeyer, Weihe, Westermann

Klinischer Studienabschnitt:

Aigner, Al-Fakhri, Alter, Arnold, Bals, Barth, Baum, Bauer, Baumann, Berger, Bien, Boekhoff, Büch, Burchert, Christiansen, Czubayko, Dominguez, Donner-Banzhoff, Engenhardt-Bacillic, Fuchs-Winkelmann, Funck, Geks, Görg, Gress, Grimm, Gudermann, Happle, Hellwig, Hertl, Herzum, Höffken, Hofman, Hörle, Hoyer, Juncas, Kann, Kill, Klenk, Klose, Köhler, Köhler, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Loff, Lohoff, Maier, Maisch, Mennel, Mittag, Mederos, Moll, Moosdorf, Müller, Neubauer, Nockher, Oeffner, Oertel, Pagenstecher, Plant, Printz, Renz, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schäfer, Schmitt, Schofer, Sesterhenn, Stief, Strauch, Vogelmeier, Wagner, Werner, Wulf, Yu, Zemlin

11 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für klinische Chemie und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik unter Leitung von Prof. Dr. Harald Renz angefertigt. Herrn Prof. Renz danke ich herzlich für die Möglichkeit in seinem Institut zu promovieren.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. Holger Garn für die stete Unterstützung, wissenschaftliche Diskussion und konstruktive Durchsicht des Manuskripts.

Frau Dr. Tanja Dicke und Frau Dr. Olivia Monika Merkel danke ich für die Hilfe und Unterstützung in vielen praktischen und theoretischen Fragen.

Für Ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft danke ich den technischen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere: Frau Anja Spies-Naumann, Frau Annika Rühl, Frau Wilma Hasted und Herrn Thomas Ruppertsberg.

Meinen Eltern, Edda und Hans-Helmut, meiner Schwester Anne, und auch meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.